



**Sofia Isabel Ferreira
Torres**

***Streptococcus agalactiae*, avaliação da
resistência a macrólidos.**



**Sofia Isabel Ferreira
Torres**

***Streptococcus agalactiae*, avaliação da
resistência a macrólidos.**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Mestre Luísa Isabel Dá Pinto Ferreira, Diretora da Bacteriologia do Laboratório de Patologia Clínica Hilário de Lima, Professora Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso, Professora do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu avô, pelo apoio precioso em todas as dificuldades, nunca me deixando desistir, nem nas maiores adversidades.

o júri

presidente	Professora Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha Professora Auxiliar Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro
arguente principal	Professora Doutora Maria Helena da Silva Santos Ramos Professora Auxiliar Convidada, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto
orientador	Mestre Luísa Isabel Dá Pinto Ferreira Técnica Superior, Laboratório de Patologia Clínica Hilário de Lima
co-orientador	Professora Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mondo Barroso Professora Auxiliar Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Queria agradecer a Doutora Luísa Ferreira, pelo esforço que tem desempenhado na orientação deste projeto, auxiliando-me com os seus vastos conhecimentos bem como, com a sua amizade, dando-me força e coragem para prosseguir mesmo diante das dificuldades.

O meu agradecimento especial para o Dr. José Lima, diretor do Laboratório de Patologia Clínica Hilário de Lima em Braga, pela disponibilidade e cedência de condições para o desenvolvimento prático deste estudo.

Não poderia deixar de agradecer à Professora Doutora Maria Helena Ramos, responsável pela Microbiologia do Centro Hospitalar do Porto- Hospital de Santo António EPE.

palavras-chave

Streptococcus agalactiae, Infecção perinatal, Profilaxia antibiótica intraparto, eritromicina, clindamicina.

resumo

Streptococcus β – hemolítico do grupo B ou *S. agalactiae* é uma das principais causas de infecções neonatais graves. A maioria das infecções neonatais podem ser prevenidas usando a profilaxia antibiótica intraparto em mulheres colonizadas por esta bactéria e que têm um risco aumentado de transmiti-la aos seus bebês. No entanto, apesar dos ensaios clínicos que demonstram a efetividade da profilaxia antibiótica intraparto, as estratégias de prevenção não foram amplamente e consistentemente implementadas, e a incidência da doença neonatal por este agente não diminuiu. Para promover uma coordenada aplicação das medidas preventivas, o CDC em conjunto com representantes de associações profissionais, publicou em 1996, recomendações para a prevenção da doença neonatal por *Streptococcus agalactiae*. Estas recomendações foram revistas em 2002 e mais recentemente em 2010.

O objetivo deste estudo foi verificar a ocorrência de colonização por *Streptococcus agalactiae* em gestantes saudáveis, avaliar a susceptibilidade dos isolados aos antibióticos e determinar os fenótipos de resistência à eritromicina.

Realizou-se um estudo envolvendo 212 gestantes que realizaram rastreio para *S. agalactiae* no Laboratório de Patologia Clínica Hilário de Lima, em Braga, no período de 1 de Julho de 2012 a 31 de Agosto de 2012. Foram colhidas amostras vaginal e retal para rastrear a presença de colonização por *S. agalactiae*. O procedimento laboratorial para a detecção da colonização por *S. agalactiae* foi o recomendado pelo CDC. Os rastreios positivos (34) foram avaliados quanto ao perfil de susceptibilidade aos antibióticos de eleição para a profilaxia (penicilina, ampicilina, eritromicina e clindamicina).

Os isolados que apresentaram resistência a eritromicina (17.6%) foram estudados para determinar o fenótipo de resistência à eritromicina, sendo que 100% desses isolados apresentaram fenótipo MLS_B constitutivo.

Neste estudo foram também incluídos 39 isolados de *S. agalactiae*, obtidos de gestantes que apresentaram rastreio positivo para este agente, sendo este rastreio realizado no Centro Hospitalar do Porto- Hospital de Santo António. Estas amostras foram estudadas quanto ao perfil de resistência à eritromicina e clindamicina apresentando uma taxa de resistência, respetivamente, de 33.4% e 15.4%, sendo que 69.2% dos isolados resistentes à eritromicina apresentavam fenótipo MLS_B constitutivo e 30.8% apresentavam o fenótipo M (resistência apenas a macrólidos).

keywords

Streptococcus agalactiae, infection perinatal, antibiotic intrapartum prophylaxis, erythromycin, clindamycin.

abstract

Group B streptococcus is a leading cause of serious neonatal infections. Most neonatal infections can be prevented using the intrapartum antibiotic prophylaxis in women colonized by the bacteria and have an increased risk to transmit it to their babies. However, despite clinical trials that demonstrate the effectiveness of intrapartum antibiotic prophylaxis, prevention strategies were not implemented widely and consistently, and the incidence of neonatal GBS disease has not declined. To promote a coordinated application of preventive measures, the CDC together with representatives of professional associations, published in 1996, recommendations for the prevention of neonatal disease by *Streptococcus agalactiae*. These recommendations were revised in 2002 and most recently in 2010.

The aim of this study was to determine the occurrence of colonization by *Streptococcus agalactiae* in healthy pregnant women, to evaluate the susceptibility of isolates to antibiotics and determine the phenotypes of erythromycin resistance.

We conducted a study involving 212 pregnant women who were screened for *S. agalactiae* in the Laboratory of Clinical Pathology Hilary of Lima, in Braga, in the period 1 July 2012 to 31 August 2012. Samples were collected vaginal and rectal to track the presence of colonization by *S. agalactiae*. The testing procedure for detection of colonization by *S. agalactiae* was recommended by the CDC. The positive screenings (34) were evaluated for susceptibility to antibiotics of choice for prophylaxis (penicillin, ampicillin, erythromycin and clindamycin).

The isolates that were resistant to erythromycin (17.6%) were studied to determine the phenotype of resistance to erythromycin, and 100% of these isolates showed constitutive MLSB phenotype.

In this study we also included 39 isolates of *S. agalactiae* obtained from women who had screened positive for this agent, and this screening held at the Centro Hospitalar do Porto – Hospital de Santo António. These samples were studied as to their resistance to erythromycin and clindamycin resistance showing a rate of, respectively, 33.4% and 15.4%, and 69.2% of isolates were resistant to erythromycin constitutive MLSB phenotype and 30.8% had the M phenotype (resistance only macrolides).

“A vida está cheia de desafios, que se aproveitados de forma criativa,
transformam-se em oportunidades”.

(Marxwell Maltz)

Índice

1.Introdução.....	1
2. Infeciologia na Gravidez	2
3. Género Streptococcus	4
4. S. agalactiae.....	7
4.1 Ecologia e Epidemiologia	7
4.2 Fatores de Virulência.....	11
4.2.1 Aderência às Superfícies Epiteliais	11
4.2.3 Invasão das Células Epiteliais e Endoteliais.....	12
4.2.3 Injúria Direta das Barreiras Celulares	14
4.2.4 Escape à Atividade Imunológica	15
4.2.5 Indução da Síndrome Séptica	18
5. Importância Clínica	20
5.1 Infecção no Homem e Mulheres Que Não Estão Grávidas.....	20
5.2 Infecção na Mulher Grávida.....	22
5.3 Doença Neonatal de Início Precoce	22
5.4 Doença Neonatal de Início Tardio	23
6. Fatores de Risco para desenvolver Doença Neonatal	25
6.1 Colonização Materna por <i>S. agalactiae</i> Detetada Entre a 35ª e a 37ª Semanas de Gestação.....	26
6.2 Mulheres Com Bacteriúria por <i>S. agalactiae</i> Durante a Gravidez	27
6.3 Gravidez Anterior Com Infecção Neonatal Precoce Por <i>S. agalactiae</i>	28
6.4 Prematuridade e Baixo Peso à Nascimento	29
6.5 Parto Prè-termo (idade gestacional <37 semanas completas) e Ruptura Prolongada de Membranas (RPM)	30
6.6 Coriamnionite.....	30
6.7 Febre Intraparto Superior a 38°C.....	31
7. Recomendações do CDC para a prevenção de Doença Neonatal por <i>S. agalactiae</i>	32
7.1 Identificação de Candidatas a profilaxia antibiótica intra-parto – Rastreio Universal para <i>S. agalactiae</i>	33
7.2 Rastreio Universal para <i>S. agalactiae</i> - Colheita e Processamento	33
7.3 Estratégias de Prevenção	37

7.3.1 Vacina Contra <i>S. agalactiae</i>	37
7.3.2 Profilaxia Antibiótica Intraparto	44
7.4 Efeitos Adversos e Consequências Imprevistas da Profilaxia Antibiótica Intraparto ...	47
7.4.1 Alergia a Antibióticos, incluindo anafilaxia.....	47
7.4.2 Resistência a Antibióticos	47
7.4.3 Aumento da Incidência de outros patógenos resistentes a antibióticos que não o <i>S. agalactiae</i>	50
8. Justificação do Estudo	52
9. Objetivos.....	53
10. Material e Métodos.....	54
10.1 População e Amostra	54
10.2 Processamento das Amostras	54
10.3 Testes Realizados	56
11. Resultados.....	58
11.1 Isolamento de <i>S. agalactiae</i>	58
11.2 Testes de Suscetibilidade a Antibióticos	59
11.3 Fenótipos de Resistência à Eritromicina	60
12. Discussão e Conclusão	61
13. Referências Bibliográficas	65

Índice de Figuras

Figura 1: Colónias de <i>Streptococcus</i> α -hemolíticos em Gelose de sangue	5
Figura 2: Colónias de <i>Streptococcus</i> β -hemolíticos em Gelose de sangue	5
Figura 3: Representação da incidência de colonização das gestantes em diversas partes do mundo.	8
Figura 4: Representação da distribuição dos serótipos de <i>S.agalactiae</i> na Europa e América. 9	
Figura 5: Representação da distribuição dos serótipos de <i>S.agalactiae</i> na África no início dos estudos.....	10
Figura 6: Representação da distribuição dos serótipos de <i>S.agalactiae</i> na África 2 anos depois do início dos estudos.....	10
Figura 7: Esquema representativo da percentagem de neonatos colonizados por <i>S.agalactiae</i> que nascem de mães colonizadas, e a percentagem desses que apresentam manifestações clínicas de doença neonatal	25
Figura 8: Gráfico representativo das taxas de incidência de DNIP consoante a raça entre 1993 e 1998.	28
Figura 9: Gráfico representativo do aumento da sensibilidade e especificidade das técnicas de cultura mediante a proximidade do parto.	35
Figura 10: Procedimento de inoculação das amostras vaginais e retais para identificação presuntiva de <i>Streptococcus agalactiae</i>	55
Figura 11: Reação de aglutinação com Slidex Strepto B da bioMérieux®	56
Figura 12: Aparelho Vitek Compact 2 da bioMérieux®	57
Figura 13: : Percentagem de rastreios positivos e negativos, realizados no Laboratório de Patologia Clínica Hilário de Lima, em Braga, de 1 de Julho de 2012 a 31 de Agosto de 2012.	58
Figura 14: Distribuição fenotípica das estirpes resistentes à eritromicina, recebidas do hospital de Santo António, no Porto.....	60

Índice de Tabelas

Tabela 1: Microrganismos mais frequentes de causar infeções durante a gestação e infetarem o embrião, feto ou recém-nascido.	3
Tabela 2: Quadro resumo dos fatores de virulência de <i>S. agalactiae</i> implicados em infeções neonatais.	19
Tabela 3: Resumo das manifestações clínicas da infeção por <i>Streptococcus agalactiae</i>	24
Tabela 4: Proteínas de membrana e serótipos de <i>Streptococcus agalactiae</i>	44
Tabela 5: Perfis de suscetibilidade dos 34 isolados de <i>S. agalactiae</i> (antibióticos incluídos na carta AST 586)	59
Tabela 6: Perfis de suscetibilidade dos 39 isolados de <i>S. agalactiae</i> recebidos do Hospital de Santo António no Porto.	59

Índice de Fluxogramas

Fluxograma 1: Regimes de Profilaxia antibiotica intra-parto recomendados para prevenção de DNIP por <i>S. agalactiae</i>	46
---	-----------

Lista de Abreviaturas

AAP: American Academy of Pediatrics

ACOG: American College of Obstetricians and Gynecologists

ALT: Ácido Lipoteicóico

CAMP: Crithie, Atkins, Munch-Peterson

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

CRM197: Cross Reactive Material 197

DNIP: Doença Neonatal de Início Precoce

DNIT: Doença Neonatal de Início Tardio

DPPC: Dipalmitol fosfatidilcolina

E.U.A: Estados Unidos da América

MG: Meio de Granada

OR: Odds Ratio

PAIP: Profilaxia Antibiótica Intraparto

PCIIa: Polissacarídeo Capsular Tipo Ia

PCIII: Polissacarídeo Capsular Tipo III

PYR: Pirrolidonil arilamidase

QIP: Quimioprofilaxia Intraparto

RPM: Ruptura Prolongada de Membranas

S. agalactiae: Streptococcus agalactiae

S. pneumoniae: Streptococcus pneumoniae

SIP: Surface Immunogenic Protein

TCB: Toxina Colérica B

TT: Toxóide Tetânico

1. Introdução

Um dos aspetos mais problemáticos que existe hoje em dia, é o tratar adequadamente uma infeção, o que a princípio, representa um paradoxo, ao considerar que nunca anteriormente se teve um tal arsenal terapêutico, com tal variedade de compostos eficazes para fazer frente a uma boa parte dos processos infecciosos produzidos por microrganismos.

Muito antes do descobrimento da penicilina e a sua possível aplicação ao tratamento de algumas infeções, já existia a resistência, porque se trata de um fenómeno natural ligado à própria produção do antibiótico. Em efeito, existem na natureza, diferentes microrganismos capazes de excretar substâncias que destruam outros considerados como seus competidores. O primeiro requisito dos microrganismos produtores de antibióticos é que a substância produzida não os afete a eles mesmos; para isso, dispõem de mecanismos seletivos que impedem que o antibiótico sintetizado os prejudique.

Este fenómeno de resistência tem aumentado e aparecido em outras bactérias e com outros antibióticos. O uso continuado de antibióticos condicionou a seleção de bactérias resistentes, que têm aumentado nas sociedades desenvolvidas.

O objetivo deste trabalho é determinar a percentagem de colonização de gestantes que realizaram o rastreio para *S. agalactiae* no Laboratório Hilário de Lima, em Braga, no período de 1 de Julho a 31 de Agosto de 2012, e avaliar o perfil de suscetibilidade aos antibióticos de eleição para a profilaxia antibiótica intra-parto, nas estirpes isoladas de rastreios positivos. O perfil de suscetibilidade a antibióticos também foi estudado de isolados provenientes de grávidas que realizaram o rastreio no Centro Hospitalar do Porto – Hospital de Santo António.

2. Infeciologia na Gravidez

A gravidez constitui um cenário particular para o desenvolvimento de infecções (Forte, M.**2000**.). Na verdade, uma em cada vinte mulheres contrai uma infecção durante a gravidez (Regan, L.**2008**.). A ameaça que representam as infecções para o embrião, o feto e o recém-nascido explica a importância do seu estudo. Obstetras e pediatras imputam-lhes abortos, partos prematuros, malformações congénitas, nati e neomortalidades e morbidade neonatal (Simões, V.H., Manso, C.S.). A doença infecciosa durante a gravidez pode comprometer a mãe, o feto ou ambos. Este contexto do binómio mãe-filho deve estar sempre presente no diagnóstico e terapêutica das doenças infecciosas na gravidez (Forte, M.**2000**.).

Para reduzirem a contribuição do fator infeccioso na mortalidade e morbidade perinatal, obstetras e pediatras devem possuir mentalidade preventiva e basearem-se na epidemiologia (Simões, V.H., Manso, C.S.).

Há uma diversidade de microrganismos responsáveis por infecções na gravidez e que causam patologia na mãe e no recém-nascido. Na tabela (1) encontra-se resumida a informação dos agentes mais frequentemente responsáveis por infecções na gravidez (Forte, M.**2000**).

Tabela 1: Microrganismos mais frequentes de causar infecções durante a gestação e infetarem o embrião, feto ou recém-nascido.

Bactérias	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i>; • <i>Streptococcus β-hemolíticos do grupo B</i>; • <i>Listeria monocytogenes</i>; • <i>Haemophilus influenza</i>.
Vírus	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Vírus do Herpes Simplex do tipo 2</i>; • <i>Vírus da Varicela Zoster</i>; • <i>Enterovírus</i>; • <i>Vírus da Imunodeficiência Humana</i>; • <i>Vírus da Hepatite B</i>; • <i>Vírus Sincicial Respiratório</i>.
Fungos	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Candida albicans</i>; • <i>Candida spp.</i>

3. Género *Streptococcus*

O Género *Streptococcus* pertence ao filo *Firmicute*, classe Bacilli, ordem Lactobacillales e família Streptococcaceae (Matthies *et al.*;2004). O *Manual of Systematic Bacteriology de Bergey* descreve os *Streptococcus* como bactérias Gram positivas, catalase negativas. Individualmente, os *Streptococcus* são esféricos ou ovóides, com menos de 2µm de diâmetro, associando-se em pares ou cadeias formando “rosários” e dividem-se por um plano perpendicular ao eixo da cadeia, mantendo nesta, muitas vezes, o aspecto de diplococos. Podem apresentar-se, também, como bacilos curtos. O comprimento da cadeia de cocos é dependente das condições de cultura, tipo de meios usados, etc. (Costa, N.M.2000.).

Embora os *Streptococcus* cresçam na presença de oxigénio, são incapazes de realizar um metabolismo respiratório. Algumas espécies são anaeróbias obrigatórias, mas a maioria dos *Streptococcus* são, no entanto, anaeróbios facultativos (aerotolerantes) (Costa, N.M.2000.).

Streptococcus são exigentes sob o ponto de vista nutritivo, crescendo melhor em meios complexos com sangue ou soro.

Alguns *Streptococcus* fabricam uma cápsula de natureza polissacarídica, como sucede com *S.pneumoniae* (pneumococo), mas a maioria dos *Streptococcus* que possuem o hidrato de carbono A, B e C de Lancefield produzem cápsulas de ácido hialurónico, mais desenvolvidas nas culturas jovens. A cápsula resiste à fagocitose pelos polimorfonucleares, e portanto, funciona como fator de virulência. *Streptococcus* têm na parede celular proteínas (M, T e R), alguns hidratos de carbono específicos – carbo-hidrato C (com capacidade antigénica, o que permite a classificação serológica de Lancefield), peptidoglicanos, etc. (Costa, N.M.2000.)

Alguns *Streptococcus* com importância médica possuem fímbrias (pili) constituídas por proteínas M revestidas de ácido lipoteicóico que se exteriorizam para fora da cápsula. Estas fímbrias são importantes para a adesão às células do hospedeiro (Costa, N.M.2000.).

A identificação da espécie é por vezes difícil. Duas características são, habitualmente, usadas para identificação das espécies importantes em infeções humanas: as propriedades hemolíticas em ágar sangue de cordeiro e a presença do hidrato de carbono específico (Lancefield).

Os padrões hemolíticos são os seguintes:

- **Streptococcus α -hemolíticos:** hemólise incompleta dos glóbulos vermelhos do meio, conferindo uma cor esverdeada em redor da colónia em ágar sangue;
- **Streptococcus β -hemolíticos:** hemólise completa conferindo um halo claro rodeando a colónia em gelose de sangue;



Figura 1: Colónias de Streptococcus α -hemolíticos em Gelose de sangue (retirada de: <http://www.laborclin.com.br/imagens/betalfa.jpg>, em 13/07/12).

Figura 2: Colónias de Streptococcus β -hemolíticos em Gelose de sangue (retirada de: <http://www.laborclin.com.br/imagens/betalfa.jpg>, em 13/07/12).

- **Streptococcus α - primohemolíticos:** combinando os dois tipos de hemólise anterior.

A atividade hemolítica é influenciada pelo tipo de meio de cultura, tipo de sangue animal usado, presença de glicose, atmosfera de incubação (as reações são mais aparentes em anaerobiose a 45% de CO₂).

A classificação puramente em padrões hemolíticos, todavia, não era suficiente para correlacionar o microrganismo com a doença ou o prognóstico. Estes cocos Gram positivos catalase negativa foram classificados com base em reações sorológicas por **Rebecca Craighill Lancefield** em 1933, no instituto Rockefeller em Nova York. Esta classificação ficou conhecida como a **classificação de Lancefield**.

A classificação dos estreptococos em grupos sorológicos baseia-se nas características antigénicas de um polissacarídeo de composição variável chamado carboidrato C, localizado na parede da célula, que pode ser detetado por diferentes técnicas imunológicas. Tomando por base esse polissacarídeo, os *Streptococcus* foram divididos em 20 grupos (grupos de Lancefield) designados por letras maiúsculas do alfabeto (A ao U, excluindo as letras I e J que não têm grupo correspondente) (**Costa, N.M.2000**). Em medicina clínica, os *Streptococcus* mais importantes são:

- **Grupo A:** *Streptococcus pyogenes*.
- **Grupo B:** *Streptococcus agalactiae*
- **Grupo D:** *Streptococcus spp.*
- **Grupo C:** *Streptococcus equisimilis*
- **Grupo G:** *Streptococcus anginosus*

4. Streptococcus agalactiae

Streptococcus agalactiae é a única espécie que pertence ao sorótipo B de Lancefield. A sua identificação presuntiva é verificada pela caracterização morfológica típica, aparecendo cinza, com colônias grandes, circulares e levemente brilhantes em meios de cultivo contendo sangue. A maioria das estirpes apresenta uma beta-hemólise discreta ao redor das colônias, mas pode existir ausência de hemólise (Spellerberg; Brandt.2007).

Existem várias provas bioquímicas para a identificação fenotípica de *S. agalactiae*, entretanto, na prática da microbiologia clínica, a observação da morfologia colonial por um microbiologista experiente e a prova de CAMP são opções suficientes para a identificação presuntiva da espécie. Nesse contexto, a escolha do teste da bacitracina, da prova da hidrólise do hipurato de sódio, dos testes que verificam o crescimento bacteriano em meio de tolerância ao sal (NaCl a 6,5%) e em 40% de bile ou teste PYR, além da prova do fator CAMP, representam o melhor conjunto de testes que suprimem possibilidades de identificação errônea com outras espécies de *Streptococcus*. Os testes serológicos ou imunoensaios disponíveis comercialmente, os quais detetam os sorogrupos de Lancefield por aglutinação de partículas de látex ligadas a anticorpos e antígenos específicos, também são excelentes para uma confirmação rápida do grupo ao qual pertence o *Streptococcus beta-hemolítico* em identificação (Spellerberg; Brandt.2007).

4.1 Ecologia e Epidemiologia

S. agalactiae tem como reservatório natural o tubo digestivo, sendo o trato genito-urinário o local mais comum de colonização secundária (CDC.1996., CDC. 2002., Abarzúa,F., Guzmán, A.M., Belmar, C. et. al.2002.; López, J.G.S., Teres, F.O. 2004.). As taxas de colonização do intróito vaginal e perianal por *S. agalactiae* variam entre 15% a 40%, segundo a região geográfica (Jolivet, R.R.2002.; López, J.G.S., Teres, F.O. 2004.).

As taxas de colonização também podem diferir entre grupos étnicos e com a idade (CDC. **1996.**). A colonização vaginal é incomum na infância mas torna-se mais comum no final da adolescência (CDC. **2002.**).

Nos Estados Unidos da América, 10% a 30% das gestantes estão colonizadas por este agente (Heath, H.**2004.**). Observaram-se prevalências de colonização por *S. agalactiae* de 18,4% no Brasil e 32% na Venezuela (Kieran, E., Matheson, M., Mann, A.G., et al.**1998.**, Beardsall, K. **2001.**). Na Europa, Dinamarca, Irlanda e República Checa apresentavam prevalências de 30%, 25,6% e 23%, respetivamente (Kieran, E., Matheson, M., Mann, A.G., et al.**1998.**). Em outros países como por exemplo a Índia (5,8%), a Líbia (5%), e a Arábia Saudita (13,9%) encontram-se taxas mais baixas (Ortiz, M.P.C., Vélez, J.D.**1996.**).

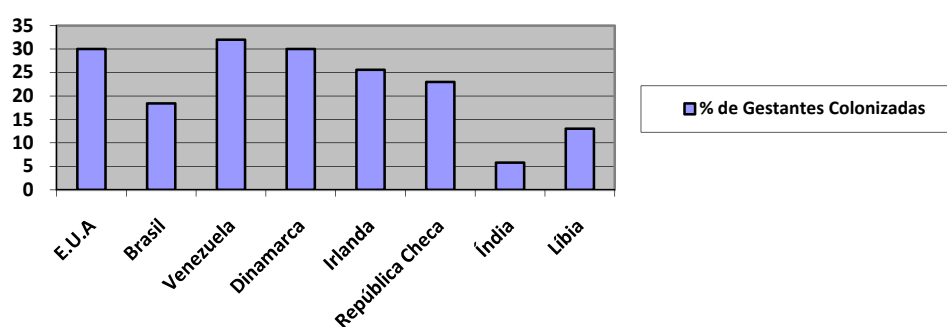


Figura 3: Representação da incidência de colonização das gestantes em diversas partes do mundo.

De acordo com a literatura, a grande variação das taxas de prevalência de colonização por *S. agalactiae* deve-se aos seguintes fatores: período de gestação no qual as culturas são realizadas; local da colheita; métodos bacteriológicos utilizados para a detecção do *S. agalactiae* e origem e características da população estudada (Kieran, E., Matheson, M., Mann, A.G., et al.**1998.**, Beardsall, K. **2001.** Jolivet, R.R.**2002.**).

O exame cultural de amostras do intróito vaginal e perianal, entre a 35ª e a 37ª semana de gestação, pode detetar as gestantes que têm maior probabilidade de estarem colonizadas por *S. agalactiae* à data do parto, ou seja, com maior risco de transmissão vertical mãe-filho.

A colonização da grávida no início da gestação não tem valor preditivo na infecção neonatal, visto que esta colonização pode ser transitória ou intermitente (Almeida, A., Agro, J., Ferreira, L.;Beardsall, K. **2001.**; Jolivet, R.R.**2002.**).

A prevalência e distribuição dos serótipos têm variado ao longo do tempo e também em relação com a idade, distribuição geográfica e local da invasão. No princípio dos anos 90, os serótipos Ia, Ib, II e III eram os responsáveis pela maioria das doenças invasivas em neonatos, principalmente o tipo III. Posteriormente, comprovou-se mudanças da prevalência, inclusive no mesmo âmbito geográfico. Também se comprovaram diferenças nas conclusões em termos dos serótipos isolados no despiste de grávidas colonizadas e os serótipos isolados em neonatos com infecção por *S.agalactiae*, dentro de uma população homogênea submetida a fatores idênticos, pelo que nem sempre deve haver relação entre prevalência materna e a virulência contra o recém-nascido (López, J.G.S., Teres, F.O. **2004.**).

Os dados actuais de prevalência de colonização e doença invasora, com variações entre as distintas publicações, poderiam resumir-se em: 98% de doença invasora na Europa e América é causada pelos serótipos Ia, Ib, II, III e V, distribuindo-se por ordem de frequência: Ia (20-40%), III (30%), e um serótipo emergido recentemente, V (15%, em adultos 30%), Ib (5-10%) e II (2-3%) (López, J.G.S., Teres, F.O. **2004.**).

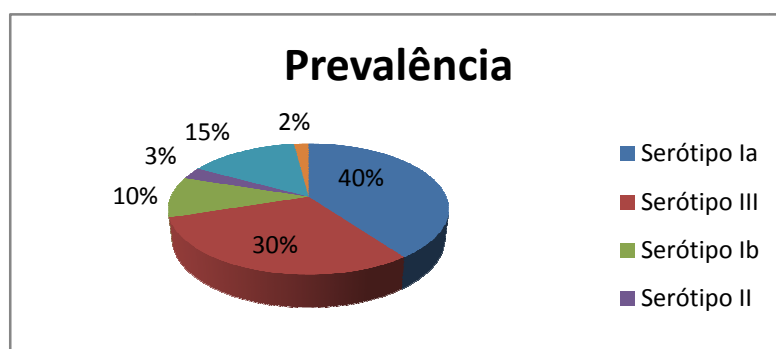


Figura 4: Representação da distribuição dos serótipos de *S.agalactiae* na Europa e América.

Em África, estudos realizados no Zimbabué com um intervalo de 2 anos, demonstra a seguinte distribuição representada nos gráficos:

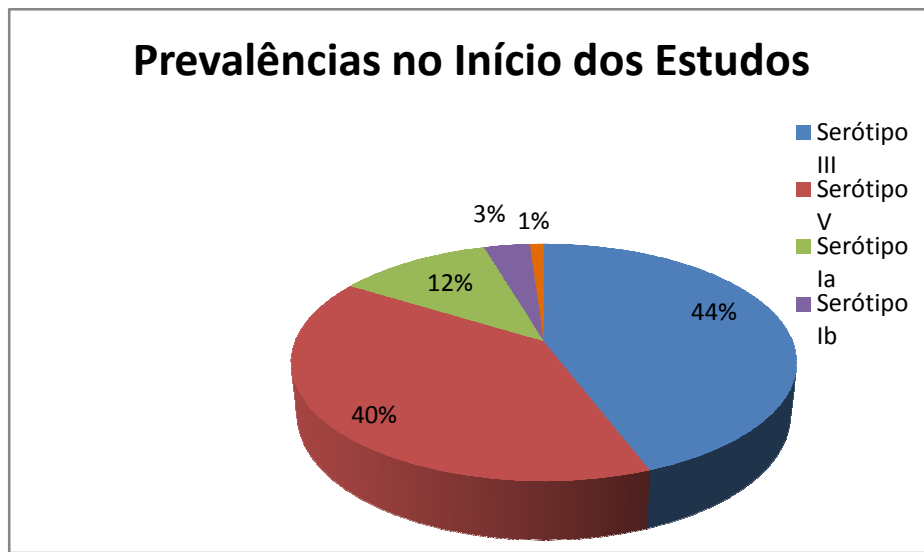


Figura 5: Representação da distribuição dos serótipos de *S.agalactiae* na África no início dos estudos.

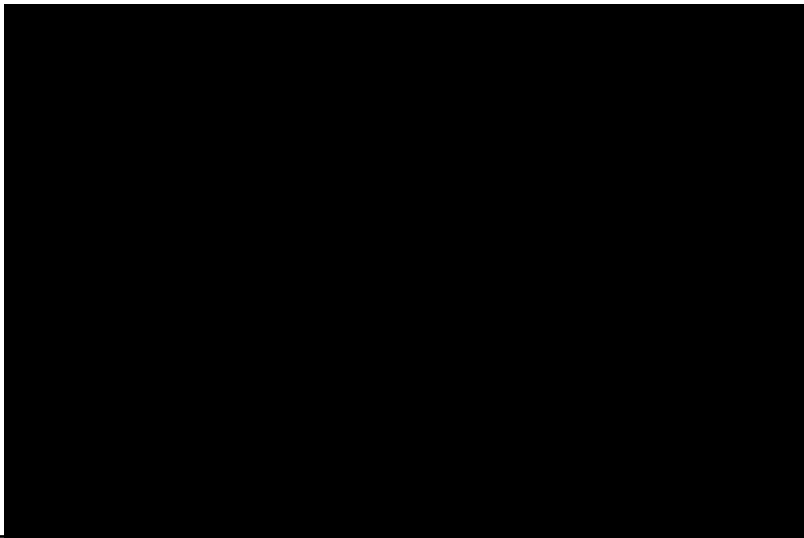


Figura 6: Representação da distribuição dos serótipos de *S.agalactiae* na África 2 anos depois do início dos estudos.

4.2 Fatores de Virulência

Para que um microrganismo produza patologia é necessário que possua fatores que lhe permitam a aderência às células do hospedeiro, gerar algum tipo de metabolito que cause dano no hospedeiro, exercer uma ação tóxica, penetrar nas células, disseminar-se através dos tecidos, evitar a atividade defensiva dos fagócitos ou a desenvolvida pelos anticorpos naturais ou adquiridos (Nizet, V., & Rubens C. **2001.**).

Estes fatores podem estar representados por diversas estruturas, geralmente, da superfície bacteriana, como as fímbrias ou outras adesinas, a camada mucosa, a cápsula, proteínas de membrana externa, bem como enzimas (Nizet, V., & Rubens C. **2001.**).

No caso do *Streptococcus* β – hemolítico do grupo B ou *S. agalactiae*, reconhecido agente etiológico de infecções neonatais graves (meningites, sepsis precoce e tardia, etc.), conhecem-se vários fatores de virulência com diferentes categorias patogénicas:

- Aderência às superfícies epiteliais;
- Invasão celular dos epitélios e das barreiras endoteliais;
- Lesão direta dos tecidos;
- Bloqueio dos mecanismos imunológicos;
- Indução da síndrome séptica.

4.2.1 Aderência às Superfícies Epiteliais

As interações iónicas e hidrofóbicas contribuem para a aderência, bem como as adesinas. Estas podem ser: proteínas bem definidas como as fímbrias, proteínas não definidas e estruturas não proteicas (Nizet, V., & Rubens C. **2001.**).

Mediante as adesinas proteicas não definidas, *S. agalactiae* pode unir-se às células do epitélio vaginal e a outras células, incluindo a mucosa faríngea, os alvéolos, as membranas placentárias, etc. Ao contrário de outros microrganismos, liga-se eficazmente às células humanas vaginais a um pH ácido habitual (Nizet, V., & Rubens C. **2001.**).

O ácido lipoteicóico (ALT), que forma parte da estrutura da parede celular, permite a união às células faríngeas fetais, mais eficientemente do que à dos adultos. Pode unir-se também a proteínas extracelulares como a fibronectina, fibrinogénio e laminina (Nizet, V., & Rubens C. **2001.**).

A proteína ligadora da laminina (Lmb), codificada pelo gene *lmb*, é uma lipoproteína similar a adesinas. Alguns pesquisadores relataram a importância direta ou indireta dessa proteína na dinâmica de colonização e invasão de *S. agalactiae* (Lindahl *et al.* **2005**).

4.2.2 Invasão das Células Epiteliais e Endoteliais

As evidências experimentais diretas indicam que a invasão celular é um passo crucial na patogénese da doença neonatal por *S. agalactiae* (Nizet, V., & Rubens C. **2001.**).

A consequência da invasão ou passagem através das células é a causa de: amnionites, aumentando assim a exposição fetal a este microrganismo, bacteriemia, disseminação sistémica e meningite. A sepsis adquirida intra – útero está dentro do grupo da denominada sepsis precoce e é geralmente fulminante. A característica de invadir a célula e viver dentro de vacúolos, como consequência do processo de endocitose, é parecido ao que ocorre em algumas doenças bacterianas entéricas, como a salmonelose, constituindo o primeiro passo para o estabelecimento de uma infeção sistémica. A chegada à cavidade amniótica pode ocorrer através de membranas intatas. Em culturas celulares, tem-se demonstrado o processo de transcitose, que quer dizer, a passagem através das células do córion sem alteração das zonas de união entre as mesmas (Nizet, V., & Rubens C. **2001.**).

No entanto, “in vivo” parece que seria necessário algum tipo de injúria prévia na membrana amniótica para que haja penetração, de tal maneira que quando está intacta, se transforma numa importante barreira de proteção fetal (Nizet, V., & Rubens C. **2001.**).

Para produzir meningite, os *Streptococcus* circulantes devem penetrar nas células endoteliais da microcirculação cerebral, que é chamada barreira hemato-encefálica. Recentemente, tem-se demonstrado que *S. agalactiae* pode efetuar transcitose em monocamadas de células endoteliais de vasos cerebrais e o isolamento de *S. agalactiae* do tipo III, que são os mais comuns em meningite neonatal, são os que se destacam nesta atividade sobre os outros sorótipos (Nizet, V., & Rubens C. **2001.**).

Além disso, são capazes de sobreviver em forma intracelular sem se multiplicar, até 24 horas depois da invasão. Esta característica é importante, uma vez que os antibióticos betalactâmicos actuam na fase logaritmo do desenvolvimento bacteriano e, se a bactéria não se está a multiplicar, não atuam eficazmente e portanto a bactéria permanece viável durante esse período de tempo, apesar do uso do antibiótico correto (Nizet, V., & Rubens C. **2001.**).

Estudando modelos tecidulares, o isolamento de *S. agalactiae* a partir de sangue de neonatos infetados são mais invasivos para as células do trato respiratório que os provenientes da vagina ou de neonatos colonizados mas sem sintomas. Estes resultados indicam que a invasão “in vitro” é um excelente marcador para demonstrar a capacidade de produzir doença invasiva (Nizet, V., & Rubens C. **2001.**).

As estirpes mutantes criadas com deficiências para invadir as células epiteliais são incapazes de produzir bacteriemia quando são aplicadas mediante aerossóis. Isto é congruente com a hipótese de que a invasão celular é indispensável para atravessar a barreira epitelial pulmonar (Nizet, V., & Rubens C. **2001.**).

4.2.3 Injúria Direta das Barreiras celulares

S. agalactiae produz uma β – hemolisina com ação citotóxica direta (citolisina formadora de poros na membrana das células do hospedeiro). Depois da invasão das células, observa-se a perda da arquitetura das microvilosidades e a ruptura da membrana citoplasmática e nuclear, como também, um inchaço acentuado dos organelos e citoplasma em geral. Este processo seria a manifestação da formação de poros na membrana celular produzida pela β – hemolisina (Nizet, V., & Rubens C. **2001.**).

A proliferação localizada das bactérias com dano dos tecidos observa-se em amostras de placenta provenientes de mulheres com corioamnionites ou em tecido pulmonar e cerebral, meningite em neonatos. A alteração das barreiras celulares epiteliais e endoteliais facilita a penetração placentária. Este mecanismo é diferente ao de invasão celular, uma vez que a invasão intracelular e a transcitose podem ocorrer sem injúria significativa das células (Nizet, V., & Rubens C. **2001.**).

Afirma-se que a produção de hemolisina esteja associada à invasão e lesão no epitélio pulmonar. Quando as células alveolares são expostas ao desenvolvimento logaritmico de *S. agalactiae* ou de produção de hemolisina, observa-se uma lesão severa dessas células que se manifesta pelo aumento da concentração da enzima lactato-desidrogenase. A liberação de proteínas a partir dos vasos para o espaço alveolar é o início e a principal característica da formação da membrana hialina que se observa na pneumonia neonatal precoce. A extensão do dano celular pode-se reduzir administrando-se um concentrado de dipalmitol fosfatidilcolina (DPPC), o maior componente surfactante humano, em concentrações equivalentes ao aumento fisiológico no líquido alveolar durante o terceiro trimestre da gestação (Nizet, V., & Rubens C. **2001.**; Gibson *et al.* **1999**).

Outro fator de virulência com atividade enzimática secretado por *S. agalactiae* é a hialuronidase, que é uma proteína com atividade hidrolítica sobre o ácido hialurônico, um polímero importante de glicosaminoglicana encontrado na matriz extracelular de tecidos animais.

Afirma-se que essa degradação facilita a disseminação do patógeno pelo tecido e fornece nutrientes após a lise do ácido hialurônico. A hialuronidase é codificada pelo gene *hyl*, expressa em altos níveis em amostras do sorótipo III e em isolados de infecções invasivas (Hynes; Walton. **2000**).

O fator CAMP é responsável pelo efeito sinérgico entre a hemólise de *S. agalactiae*, quando este é inoculado de forma adjacente a uma estirpe de *Staphylococcus aureus*. Este fator é uma proteína extracelular que lisa a membrana dos eritrócitos pré-tratados com a β – toxina de *Staphylococcus*, que é uma esfingomielinase. Há evidências muito limitadas quanto à função deste fator (Nizet, V., & Rubens C. **2001**.).

Finalmente, o **ALT** é citotóxico para uma variedade de células humanas, incluindo células embrionárias cerebrais e amnióticas, mas não se conhece com certeza a sua contribuição para a lesão celular (Nizet, V., & Rubens C. **2001**.).

4.2.4 Escape à Atividade Imunológica

Uma vez que *S. agalactiae* penetrou no tecido pulmonar ou no sangue, inicia-se uma resposta imune. Os elementos centrais são os neutrófilos e, em menor proporção, os macrófagos mononucleados. Para que ocorra a fagocitose de forma adequada é necessário que haja opsonização. Sem a participação dos anticorpos específicos, a opsonização diminuí drasticamente, e conseqüentemente a fagocitose também. Por isso, os neonatos mais susceptíveis são aqueles que têm um déficit:

- Da fagocitose;
- Da concentração de imunoglobulina serótipo específica anti *S. agalactiae*;
- Da via clássica e/ou alternativa do complemento (Nizet, V., & Rubens C. **2001**.)

Além destes fatores do hospedeiro, *S.agalactiae* possui uma série de fatores de virulência que dificultam a atividade imunológica, particularmente a cápsula (Nizet, V., & Rubens C. **2001.**), que apresenta função antifagocítica, ou seja, é um elemento que confere proteção ao microrganismo contra a deposição de fragmentos opsonizantes C3b do sistema complemento, os quais sinalizam a migração de células de defesa do sistema imune ao sítio da infecção (Marques *et al.* **1992**).

Existem nove serótipos conhecidos, até ao momento, de *S.agalactiae*: Ia, Ib, Ic, II, III, IV, V, VI e VII. Quase todos contêm os mesmos quatro componentes monossacarídicos: glucose, galactose, N- acetilglucosamina e ácido siálico. Obviamente, estão agrupados de maneira diferente em cada serótipo, o que lhes confere diferenças antigénicas (Nizet, V., & Rubens C. **2001.**). O ácido siálico é o componente essencial para o serótipo III. Depois de se tratar com sialidase a cápsula de *S. agalactiae* do serótipo III, esta já não tem capacidade de desenvolver a produção de anticorpos protetores contra a infecção por *S. agalactiae*. Além disso, os anticorpos derivados das cápsulas nativas de *S. agalactiae* serótipo III só se unem à cápsula nativa, não efetuando nenhuma resposta frente à cápsula alterada (Nizet, V., & Rubens C. **2001.**).

É relevante mencionar que *S. agalactiae* pode regular a expressão da cápsula, de acordo com o meio: as estirpes capsuladas são mais invasivas para o epitélio respiratório. A cápsula pode mascarar certas adesinas. Na colonização da mucosa pode haver um balanço dinâmico, como a produção de cápsula suficiente para evitar a fagocitose, mas não a necessária para impedir a interação com as células do epitélio (Nizet, V., & Rubens C. **2001.**).

Incrustadas a esta cápsula hidracionada encontram-se as proteínas de membrana. Estes antígenos proteicos, com capacidade imunogénica, expressam-se de forma variável pelos distintos serótipos (López, J.G.S., Teres, F.O. **2004.**).

O primeiro antígeno de superfície identificado em *S. agalactiae* foi o antígeno C. Com a caracterização do antígeno C, foi verificado que essa proteína superficial é composta por outros dois componentes proteicos não relacionados, as proteínas α e β , que também compõem a gama de fatores de virulência de *S. agalactiae*. O papel da proteína α na patogênese é pouco conhecido, havendo relatos de que a inibição do gene que codifica o antígeno α -C atenua a virulência de *S. agalactiae* e que há participação dessa proteína na indução da resposta imune do hospedeiro (Lindahl *et al.* **2005**).

Já a proteína β interage com diferentes componentes do sistema imune, IgA-Fc sérica e factor H (uma proteína reguladora da via alternativa do sistema complemento), contribuindo com mecanismos de escape do patógeno frente ao sistema imune do hospedeiro (Lindahl *et al.* **2005**).

Uma outra proteína de superfície presente em estirpes de *S. agalactiae*, e que é muito similar ao antígeno C, é o antígeno R (possuindo 4 subtipos), que foi descoberto por Wilkinson (1972). Pouco é conhecido sobre as propriedades moleculares desses diferentes antígenos, e também não é conhecido se são constituídos por mais de um componente como acontece no antígeno C (Lindahl *et al.* **2005**).

Outras proteínas são conhecidas, como a proteína Rib, a proteína imunogénica de superfície SIP (“surface immunogenic protein”), a C5a peptidase, que é uma enzima codificada pelo gene cromossomal *scpB*, é uma serinoprotease capaz de clivar o factor C5a do sistema complemento, o qual é responsável pelo recrutamento de neutrófilos ao sítio infeccioso (Chmouryguina *et al.* **1996**). Estudos apontaram ainda que a C5a peptidase pode se ligar à fibronectina e que colabora com a adesão e invasão de células epiteliais (Cheng *et al.* 2002).

4.2.5 Indução da Síndrome Séptica

A síndrome séptica produz-se ao falharem as barreiras naturais, sejam as epiteliais ou as imunológicas. A sepsis precoce é quase indistinguível do choque séptico produzido pelas bactérias Gram negativas: hipotensão, hipertensão pulmonar, hipoxemia tecidual e acidose, instabilidade térmica, coagulação intravascular disseminada, neutropenia e finalmente falha sistêmica multiorgânica. Em alguns estudos experimentais foram demonstradas duas fases de resposta inflamatória do hospedeiro: uma fase aguda (< 1 hora) que se manifesta pelo aumento da pressão arterial pulmonar e redução da oxigenação arterial (aumento do tromboxano B2 sérico). Estes parâmetros mantêm-se na fase tardia (2-4 horas), na qual vai havendo progressivamente falha cardíaca e a acidose (aumento de TNF- alfa e 6-ceto-prostaglandina). Nos ratos, *S. agalactiae* induz uma resposta Th1 similar quanto à liberação de citocinas: IL-2 e interferon-gamma. A primeira aumenta entre as 12 e 72 horas e os anticorpos contra ela aumentam a mortalidade. Por enquanto o papel do interferon-gamma não é tão claro. Na síndrome séptica intervém o óxido nítrico, uma vez que, quando *S. agalactiae* está em contato com artérias mesentéricas, produz-se uma menor resposta a noradrenalina (presença de óxido nítrico). Isto sugere o papel cumprido pela enzima óxido nítrico sintetase quando se produz hipotensão sistêmica. Na síntese desta enzima, que contribui para o aumento do óxido nítrico, intervém a β – hemolisina. Este quadro de hipotensão, favorecido de alguma maneira pela β – hemolisina, é similar ao produzido nos casos severos de choque por *Streptococcus pyogenes* (Nizet, V., & Rubens C. 2001.).

Tabela 2: Quadro resumo dos fatores de virulência de *S. agalactiae* implicados em infecções neonatais. (Tabela retirada de: Nizet, V., & Rubens C. **2001**).

Categoria Patogénica	Mecanismos Específicos	Determinantes da virulência
Aderência à superfície epitelial	Colonização da mucosa vaginal. Aderência ao epitélio respiratório. União à fibronectina, fibrinogénio e a laminina.	Adesinas preoteicas não definidas. Ácido lipoteicoico.
Invasão celular das barreiras epiteliais e endoteliais	Invasão coriônica/ transcitose. Invasão do epitélio pulmonar. Invasão do endotélio dos vasos pulmonares. Invasão do endotélio dos vasos cerebrais.	Invasões proteicas não definidas
Lesão direta dos tecidos	Lesão dos tecidos placentários. Lesão das células epiteliais pulmonares. Lesão das células endoteliais dos vasos pulmonares.	β – hemolisina Proteases Colagenase Factor CAMP Hialuronidato liase Ácido Lipoteicóico
Escape à atividade imunológica	Resistência á opsonofagocitose Inibição da activação do complemento Dificuldade no recrutamento ou afluência de neutrófilos União dos anticorpos não imunes Resistência à morte intracelular	Polissacarídeo capsular Peptidase C5a Proteína C de superfície Factor CAMP Hialuronidato liase
Indução da síndrome séptica	Libertação de citocinas (IL-1, TNF –alfa) Indução da enzima óxido nítrico intetase	Peptidoglicano da parede celular β - hemolisina

5.Importância Clínica

5.1 Infecção no Homem e em Mulheres que não estão grávidas

Streptococcus agalactiae foi identificado como causa de doença na espécie humana em 1938 por Frey (Lança, S., Serrano, P., Barata, J.**2006.**). Na década de 70 do século passado foi considerado, nos EUA, o principal agente de sépsis e meningite no período neonatal, bem como de infecções puerperais. Nos últimos 20 anos tem sido registado na literatura um aumento notório do número e de casos de infecção por *S. agalactiae* em adultos, fora do contexto gestacional e puerperal, com uma taxa de incidência variável entre os 4,4 e os 7,2 casos por 100.000 habitantes, consoante as casuísticas, valores que representam um incremento de cerca de 100% relativamente aos dados publicados até à década de 80 do século XX (Lança, S., Serrano, P., Barata, J.**2006.**).

Os doentes idosos e os portadores de doenças crónicas, como a diabetes mellitus, a cirrose hepática e as neoplasias, são os que apresentam maior risco (Lança, S., Serrano, P., Barata, J.**2006.**). O aumento da esperança de vida e as co-morbilidades que lhes estão associadas parecem ser os principais fatores responsáveis pelo acréscimo do número de casos constatado nos últimos anos, não havendo dados conclusivos que permitam correlacionar a modificação do espectro da doença com eventuais alterações da virulência do agente, nem com modificações antigénicas que têm sido detetadas nalgumas estirpes (Lança, S., Serrano, P., Barata, J.**2006.**).

O envelhecimento, só por si, representa um importante fator de risco, já que a taxa de incidência da infecção quadruplica nos grupos etários acima dos 60 anos, mesmo na ausência de patologias crónicas concomitantes (Lança, S., Serrano, P., Barata, J.**2006.**).

A diabetes mellitus é a entidade nosológica mais frequentemente associada à infecção por *S. agalactiae*, estando presente em cerca de 25% dos casos documentados de infecção por este agente.

A infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana Adquirida aparece também como fator de risco significativo na maioria das casuísticas (Lança, S., Serrano, P., Barata, J.**2006**.).

O *S. agalactiae* coloniza a pele, o trato respiratório alto, o tubo digestivo e o aparelho urogenital de muitos indivíduos saudáveis. Sob o ponto de vista patogénico, a infecção por *S. agalactiae* apresenta um tropismo seletivo para a pele e tecido celular subcutâneo, sendo responsável por quadros de celulite, fascíte, infecção de escaras de pressão e de lesões cutâneas crónicas associadas à diabetes. O pulmão, trato urinário e o osso constituem, depois da pele, os locais de infecção mais frequentes, seguindo-se o tecido valvular cardíaco, as meninges e o peritонеu como estruturas preferencialmente afetadas, embora de forma muito mais rara (Domingo, P., Barquet, N., Alvarez, M., Cool, P. et al. 1997.; Munoz, P., Llancaqueo, A., Rodriguez, M. C. et al. **1997**.; Farley, M.M. 2001.; Panupong, L., Chatrchai, W.**2001**.).

A disseminação hematogénica pode ocorrer a partir de qualquer porta de entrada, sendo, contudo, frequentes quadros de bacteriémia sem ponto de partida identificável (Lança, S., Serrano, P., Barata, J.**2006**.).

A infecção ocular por *S. agalactiae* constitui um evento excecional, estando descritos apenas cerca de 20 casos na literatura mundial (Lee, S.Y., Chee, S.P. **2002**.)

O empiema constitui uma entidade igualmente rara, representando o *S. agalactiae* menos de 4% de todos os microrganismos isolados em situações de derrame pleural de etiologia infecciosa (Lança, S., Serrano, P., Barata, J.**2006**.).

O compromisso osteo-articular representa 4 a 14% das manifestações infecciosas devidas a *S. agalactiae*, sendo as focalizações articulares mais frequentes que as ósseas (Lança, S., Serrano, P., Barata, J.**2006**.).

5.2 Infecção em Mulheres Grávidas

Em mulheres grávidas colonizadas, habitualmente assintomáticas, a disseminação vaginal ascendente pode provocar a rutura precoce das membranas por diversos mecanismos, originando infecção intra – útero que, dependendo da sua intensidade, pode provocar parto prematuro, corioamnionites e inclusive morte fetal ou, se o parto chega a decorrer, doença invasiva pós- natal no neonato (López, J.G.S., Teres, F.O. 2004.).

Durante um parto vaginal normal, 50% de recém-nascidos de mães portadoras ficam contaminados e apenas 1-2% destes infetados por transmissão vertical, desenvolvem infecção sintomática precoce, sendo mais frequente a colonização assintomática da pele e das mucosas. Além disto, estima-se que cerca de 6% de neonatos são colonizados por via horizontal, durante a estadia na maternidade, bem como através da proximidade com a mãe ou por outros contatos, podendo desenvolver-se uma doença de início tardio (López, J.G.S., Teres, F.O. 2004.).

5.3 Doença Neonatal de Início Precoce

A Doença Neonatal de Início Precoce (**DNIP**) é o mais comum tipo de doença neonatal por *S. agalactiae*, ocorrendo em crianças com menos de 7 dias de idade. Na DNIP, o neonato é infetado pela exposição ao *S. agalactiae* antes ou durante o parto. Recentemente, taxas de mortalidade entre os 4 e 6 % foram descritas nos Estados Unidos. Algumas infecções de início precoce podem acontecer quando o neonato é exposto à bactéria durante a passagem pelo canal de parto, mas a maioria das infecções de início precoce são provavelmente causadas por ascendente propagação da bactéria a partir do trato genital materno para o líquido amniótico, aquando ruturas de membranas, no qual as bactérias se multiplicam, permitindo-lhes colonizar o trato respiratório do feto.

Em alguns casos, a transmissão do *S. agalactiae* no interior do líquido amniótico pode ocorrer com as membranas intactas (Lindahl, G., Carlemalm, M.S., Areschoug, T. 2005.).

Após entrada da bactéria no tracto respiratório do feto, pode desenvolver-se **pneumonia** e as bactérias podem propagar-se para a corrente sanguínea e causar **septicemia**. A disseminação sanguínea permite a chegada da bactéria a inúmeros órgãos, e subsequente penetração tecidual, ocasionando manifestações como a **meningite** e a **osteomielite** (Lindahl *et al.* 2005.).

5.4 Doença Neonatal de Início Tardio

A Doença Neonatal de Início Tardio (DNIT) é menos comum do que a DNIP mas está a tornar-se relativamente mais importante, uma vez que a sua incidência não diminuiu, como resultado das medidas profiláticas que causaram um decréscimo da incidência da DNIP (Lindahl *et al.* 2005.).

A DNIT ocorre entre a primeira semana e os três meses de idade. Pouco é conhecido sobre a patogénese da infeção de início tardio, mas a transmissão do organismo da mãe para a criança provavelmente explica a maior parte das infeções neste período. Em alguns casos, DNIT ocorre como epidemias nosocomiais que afetam primariamente bebés prematuros, que provavelmente adquirem a bactéria por transmissão horizontal. As duas manifestações clínicas mais comuns de DNIT são **meningite** e **bacteriemia** sem foco de infeção. As taxas de mortalidade de DNIT são geralmente mais baixas do que as de DNIP e têm sido descritas entre 2 a 6% (Lindahl *et al.* 2005.).

É importante salientar, que uma substancial proporção de neonatos que sobrevive a uma infecção por *S. agalactiae* fica com sequelas. Após casos de meningite neonatal, sequências neurológicas ocorrem em 50% dos sobreviventes e incluem atraso mental, cegueira cortical, hidrocefalia, perda de audição e atraso da fala (Lindahl *et al.* 2005.).

Tabela 3: Resumo das manifestações clínicas da infecção por *Streptococcus agalactiae*. (retirada de: López, J.G.S., Teres, F.O. **2004.**).

Gestacional	Grávida: Infecção urinária por <i>S. agalactiae</i> .	
	Evolutiva	Parto prematuro com infecção invasora
		Abortos espontâneos
		Morte fetal
Perinatal	Parturienta	Febre intraparto
		Patologia invasora (rara)
	Neonato	Doença neonatal precoce: sepsis, pneumonia
		Doença neonatal tardia: meningite, invasões locais

6. Fatores de Risco para Desenvolver Doença Neonatal

Porque a doença se desenvolve apenas numa fração de neonatos colonizados por *S. agalactiae* durante o nascimento, muitos estudos têm tentado identificar fatores que podem aumentar o risco de desenvolvimento da doença (Lindahl *et al.* 2005.).

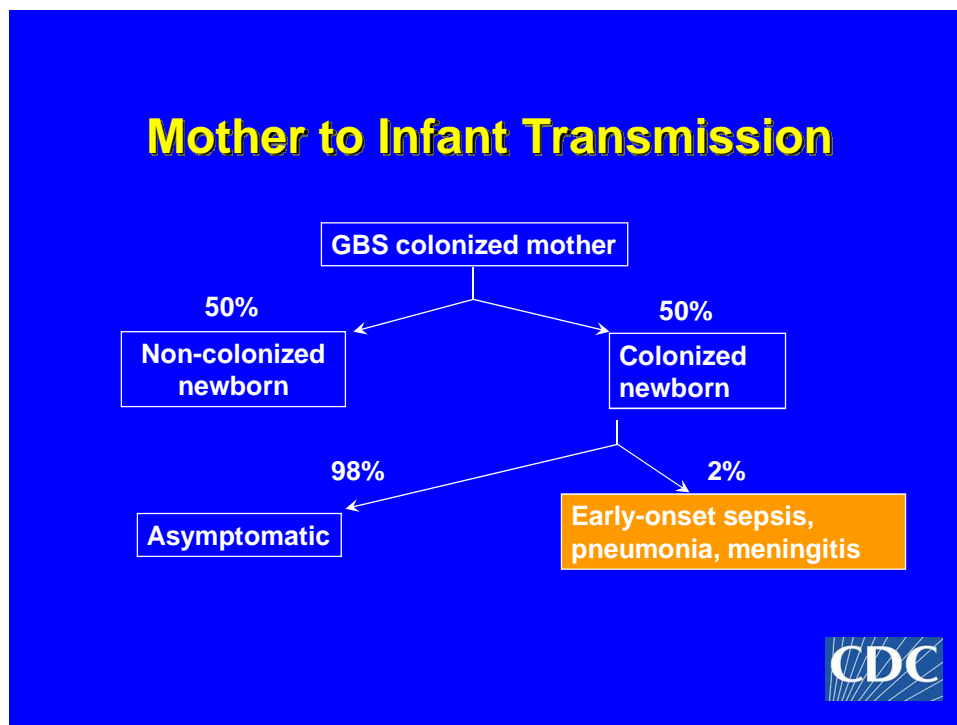


Figura 7: Esquema representativo da percentagem de neonatos colonizados por *S. agalactiae* que nascem de mães colonizadas, e a percentagem desses que apresentam manifestações clínicas de doença neonatal. (esquema retirado de www.cdc.gov/GBS_slideset_DEC2_forweb em 18 de Julho de 2008).

Resultados de estudos indicam que diversos fatores obstétricos, fatores relacionados com a mãe e fatores relacionados com o neonato aumentam a probabilidade de ocorrer doença neonatal precoce por *S. agalactiae* (CDC, 1996).

Os fatores de risco considerados pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC) são:

6.1 Colonização Materna Por *S. agalactiae* Detetada Entre a 35ª e 37ª Semana Da Gestação

Crianças nascidas de mulheres que foram identificadas como portadoras de *S. agalactiae* no rastreio pré-natal, tem 29 vezes mais risco de desenvolver doença neonatal de início precoce por *S. agalactiae* do que crianças de mulheres cujas culturas foram negativas (CDC. **1996.**)

A colonização da grávida no início da gestação não tem valor preditivo na infecção neonatal, visto que esta colonização pode ser transitória ou intermitente (Almeida, A., Agro, J., Ferreira, L.; Benitz, W.E., Gould, J.B., & Druzin, M.L. **1999.**; Jolivet, R.R. **2002.**).

Vários estudos demonstraram que existem fatores que podem contribuir no estado de colonização, tais como a idade, raça, educação, número de gestações, paridade, entre outros, porém a relação entre estas variáveis e a colonização muitas vezes não é consistente. A incidência de doença por *S. agalactiae* é mais elevada entre crianças nascidas de mães com idade inferior aos vinte anos (Schuchat *et al.* **1994.**).

A raça é um outro exemplo disso, Regan et al. observou que mulheres de raça negra e hispânica possuíam uma maior predisposição na colonização por *S. agalactiae*, com frequências de 21,2% e 20,9% respetivamente, comparada com 13,7% nas grávidas caucasianas. Mas encontrou diferenças em diferentes regiões, demonstrando que as gestantes hispânicas possuíam a taxa mais alta de colonização em Nova York, e as taxas mais baixas em Washington, Oklahoma e Louisiana comparativamente com outros grupos étnicos (Regan, J.A., Klebanoff, M.A., Nugent, R.P. **1991.**).

Outras mulheres com uma probabilidade maior de terem uma criança com doença invasiva por *S. agalactiae* são aquelas que estão com uma intensa colonização por *S. agalactiae* nas culturas genitais ou com baixos níveis de anticorpo anti-SGB capsular (CDC. **1996.**).

A associação entre a colonização vaginal materna no momento do parto e a infecção neonatal de início precoce por *S. agalactiae* tem sido um poderoso impulso para o desenvolvimento de estratégias de prevenção baseadas na identificação de mulheres grávidas portadoras da bactéria (Benitz, W.E., Gould, J.B., & Druzin, M.L. 1999.).

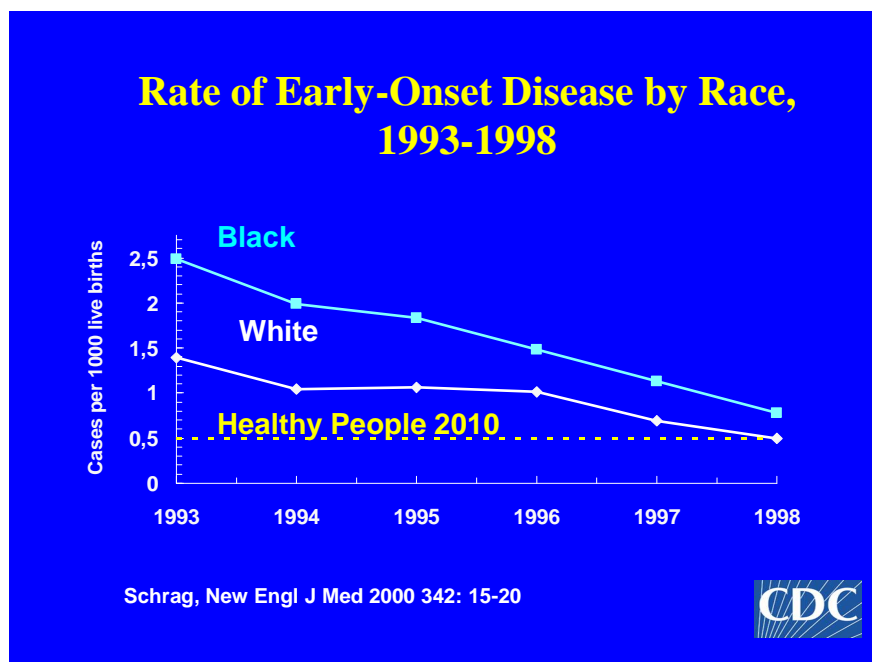


Figura 8: Gráfico representativo das taxas de incidência de DNIP consoante a raça entre 1993 e 1998. (esquema retirado de www.cdc.gov/GBS_slideset_DEC2_forweb em 18 de Julho de 2008).

6.2 Mulheres Com Bacteriúria Por *S. agalactiae* Durante A Gravidez

Bebés nascidos de mulheres com bacteriúria por *S. agalactiae* durante a gravidez são mais frequente e fortemente colonizados com *S. agalactiae* e podem ter um risco aumentado para doença invasiva por este agente. A rutura prolongada de membranas (>18 horas antes do parto) aumenta substancialmente o risco de doença neonatal invasiva por este agente (Benitz, W.E., Gould, J.B., & Druzin, M.L. 1999).

Baker (1997) refere que o *S. agalactiae* coloniza o intróito vaginal e a região perianal em 20 a 24% das grávidas e causa bacteriúria assintomática em cerca de 1%. McKenna et al. (2003) verificaram que apenas 30,2% das gestantes com bacteriúria assintomática por *S. agalactiae* no 1º trimestre de gestação possuíam culturas positivas do intróito vaginal entre a 35ª-37ª semanas de gestação. Devido ao fato de terem encontrado uma frequência tão baixa, sugeriram que não se devia equiparar bacteriúria assintomática no 1º trimestre com o estado de colonização por *S. agalactiae* entre a 35ª-37ª semanas de gestação.

Um único estudo prospetivo (Moller et al.), fornece dados que permitam uma comparação direta das taxas de incidência da doença neonatal em bebés nascidos de mães com ou sem bacteriúria por *S. agalactiae* durante a gravidez (Benitz, W.E., Gould, J.B., & Druzin, M.L. 1999.).

Os dados dos estudos realizados até então, não permitem determinar o risco que as crianças nascidas de mães que tiveram bacteriúria por *S. agalactiae* durante a gravidez têm de desenvolver doença neonatal por este agente, mas permitem observar que existem elevadas taxas de incidência da doença em crianças nascidas dessas mulheres (Benitz, W.E., Gould, J.B., & Druzin, M.L. 1999.).

6.3 Gravidez Anterior Com Infecção Neonatal Por *S. agalactiae*

Quando uma mulher teve uma criança anterior com doença invasiva por *S. agalactiae*, é normal considerar-se que essa mulher tem um elevado risco de ter uma criança colonizada por *S. agalactiae* e que desenvolva doença invasiva por esse agente. Apesar de apenas existirem quatro casos descritos na literatura de doença neonatal invasiva em gravidezes seguidas da mesma mulher, já foram vistos outros casos deste evento, de forma que ele provavelmente não é tão incomum como é sugerido pela raridade dos casos notificados (Benitz, W.E., Gould, J.B., & Druzin, M.L. 1999.).

As mulheres podem permanecer colonizadas com a mesma estirpe de *S. agalactiae* por períodos prolongados e pode deixar de produzir níveis de anticorpos específicos que lhe confirmam proteção (Benitz, W.E., Gould, J.B., & Druzin, M.L. **1999.**).

É provável que o risco de ter crianças com doença invasiva por *S. agalactiae* é muito maior em gravidezes subsequentes, mas este risco não pode ser quantificado de forma mais precisa (Benitz, W.E., Gould, J.B., & Druzin, M.L. **1999.**).

6.4 Prematuridade e Baixo Peso À Nascimento

O elevado risco de ocorrer doença neonatal por *S. agalactiae* em crianças prematuras e de baixo peso à nascença tem sido reconhecido ao longo dos anos. Inúmeros dados demonstram que entre as crianças com infecção por *S. agalactiae*, as crianças prematuras e com baixo peso à nascença estão sobrerrepresentadas, achados confirmados em estudos de caso-controlo. O gradiente de maior risco com a diminuição dos pesos à nascença também foi delineado. Yancey et al. (**1996**) demonstrou um progressivo aumento do risco de sepsis neonatal com a diminuição da idade gestacional. Este estudo confirmou que existem diferenças estatisticamente significativas do gradiente de risco para a diminuição do peso à nascença e para a diminuição da idade gestacional (Benitz, W.E., Gould, J.B., & Druzin, M.L. **1999.**)

O início do trabalho de parto prematuro é fortemente correlacionado com infecção materna subclínica, o que pode contribuir para a alta prevalência de doença neonatal de início precoce por *S. agalactiae* nas crianças prematuras. Logo o início espontâneo do trabalho de parto prematuro deve ser considerado um indicador clínico de possível infecção intrauterina por *S. agalactiae* (Benitz, W.E., Gould, J.B., & Druzin, M.L. **1999.**).

6.5 Parto Pré-termo (idade gestacional < 37 semanas completas) e Ruturas Prolongada de Membranas (RPM)

A rutura prolongada de membranas (> 18 horas antes do parto) aumenta substancialmente o risco de doença neonatal invasiva por *S. agalactiae* (Benitz, W.E., Gould, J.B., & Druzin, M.L. **1999.**).

Um grande número de artigos publicados, indicam que a RPM >18 horas ocorre em 12,5% dos partos e é associada com um odds ratio (OR) de 7.28 (95% CI: 4,42 – 12,0). A RPM antes do início do trabalho de parto ocorre em 20-25% das grávidas. A RPM é mais comum entre mulheres que estão colonizadas por *S. agalactiae* ou mulheres que já tiveram uma criança com infecção por *S. agalactiae*, particularmente entre crianças prematuras, mas nem as taxas de incidência nem o OR foi calculado para essas crianças (Benitz, W.E., Gould, J.B., & Druzin, M.L. **1999.**).

A rutura prematura das membranas ocorre em 1 a 2% das gravidezes e é um importante fator de risco para pneumonia ou sepsis neonatal (Benitz, W.E., Gould, J.B., & Druzin, M.L. **1999.**).

A taxa de incidência da doença neonatal em crianças nascidas de mulheres colonizadas por *S. agalactiae* após rutura prematura de membranas é elevada (33% a 50%) (Benitz, W.E., Gould, J.B., & Druzin, M.L. **1999.**).

6.6 Corioamnionite

Crianças nascidas de mulheres com corioamnionite são de alto risco para sepsis neonatal, causada por *S. agalactiae* ou por outros microrganismos, e pode ser o único risco de infecção, mesmo após profilaxia antibiótica intraparto (Benitz, W.E., Gould, J.B., & Druzin, M.L. **1999.**).

Segundo as recomendações Merenstein's, crianças que nascem de mães com corioamnionite devem ter uma avaliação completa para sepsis por *S. agalactiae* e devem receber um tratamento empírico, até que a hipótese de infecção seja excluída, independentemente de as suas mães receberem tratamento intraparto (Benitz, W.E., Gould, J.B., & Druzin, M.L. **1999.**).

6.7 Febre Intraparto Superior 38°C

A maioria dos pediatras acreditam que febre intraparto $> 37,5^{\circ}\text{C}$, $> 38^{\circ}\text{C}$ ou febre sem definição adicional estão associadas a um aumento do risco de infecção neonatal por *S. agalactiae*, embora não existem até a data dados que permitam quantificar esta relação (Benitz, W.E., Gould, J.B., & Druzin, M.L. **1999**).

Obstetras podem diagnosticar corioamnionite, a qual está fortemente associada com infecção fetal e neonatal, em qualquer mulher com febre elevada durante o parto.

Mulheres que recebem epidural têm maior probabilidade de ter febre intraparto e as suas crianças são mais provavelmente avaliadas para detecção de sepsis e recebem terapia antibiótica profilática. Durante a epidural, a temperatura materna aumenta de $0,08^{\circ}\text{C}$ a $0,14^{\circ}\text{C}$ por hora, excedendo os 38°C em 10 a 15% das mulheres. Contudo, febres que excedam os $38,5^{\circ}\text{C}$ raramente são observadas. Por este motivo o estabelecimento de uma febre limite para mulheres que são submetidas a epidural poderia ser apropriada. Os dados disponíveis não permitem detetar limiares de temperatura específicas acima das quais a profilaxia, screening, ou terapia empírica são apropriadas (Benitz, W.E., Gould, J.B., & Druzin, M.L. **1999**).

7. Recomendações Do CDC Para A Prevenção De Doença Neonatal Por *S. agalactiae*

Em 1996, o Centers for Disease Control and Prevention (CDC) promoveu uma abordagem coordenada de prevenção entre os cuidados obstétricos e pediátricos entre profissionais de saúde e entre o pessoal de laboratório de microbiologia clínica, e o CDC desenvolveu em 1996, recomendações de prevenção em conjunto com peritos de diferentes áreas e com os representantes da American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG), American Academy of Pediatrics (AAP) e outras organizações profissionais (CDC.1996.). Estas recomendações baseavam-se no uso de uma das duas estratégias de prevenção (CDC.1996.).

A primeira estratégia era baseada na detecção vaginal e rectal de *S. agalactiae* em todas as mulheres entre a 35^a e a 37^a semanas de gestação e a administração de antibióticos intra-parto a todas as portadoras da bactéria e a todos os partos prematuros menores que a 37^a semanas de gestação. A segunda estratégia baseava-se na administração de antibióticos intra-partos a mulheres que desenvolviam um ou mais fatores de risco (desenvolvidos no Capítulo 6) no momento do parto ou da rutura de membranas (CDC.1996.).

Com a instituição das estratégias preventivas recomendadas pelo CDC em 1996, a incidência da infeção neonatal precoce decresceu ao longo dos anos cerca de 70%. Além disso, desde a liberação de linhas diretrizes de 1996, novos dados foram analisados para avaliar a eficácia destas estratégias de prevenção. Em função destes novos dados, em 2002, CDC consultou múltiplos parceiros e fez uma revisão das recomendações emitidas em 1996 (CDC.2002), e uma nova revisão em 2010 (CDC.2010).

Obstetras e profissionais de saúde dos cuidados neonatais, em conjunto com os profissionais do laboratório de microbiologia, deverão adotar as seguintes recomendações para a prevenção da doença neonatal por *S. agalactiae* (CDC.2010).

7.1 Identificação De Candidatas Para A Profilaxia Antibiótica Intra-Parto – Rastreio Universal Para *S. agalactiae*

Segundo as recomendações do CDC devem receber quimioprofilaxia antibiótica intra-parto:

- Mulheres com bacteriúria por *S. agalactiae* durante qualquer trimestre da gravidez e mulheres que tiveram uma criança anterior com doença invasiva por *S. agalactiae*, mesmo que não tenha sido realizado o rastreio universal.
- Mulheres com infecção sintomática ou assintomática do trato urinário causada por *S. agalactiae*, que foram tratadas durante a gravidez de acordo com os padrões atuais, devem receber antibióticos intra-parto independentemente do resultado do rastreio;
- Todas as mulheres grávidas devem realizar o rastreio entre a 35^a-37^a semanas de gestação para avaliar o seu estado de colonização, sendo que as que se encontrarem colonizadas, devem receber quimioprofilaxia antibiótica intra-parto, a não ser que seja realizada uma cesariana.
- Por circunstâncias em que os resultados de rastreio não estão disponíveis no momento do trabalho de parto, a profilaxia antibiótica intra-parto deve ser dada às mulheres que apresentam fatores de risco obstétrico (referidos no Capítulo 6).

Os profissionais de saúde devem informar as mulheres sobre o resultado do teste de rastreio e informá-las das intervenções recomendadas.

7.2 Rastreio Universal Para *S. agalactiae* – Colheita e Processamento

Vários estudos têm demonstrado que a detecção de *S. agalactiae* no trato genital/anal no período final da gestação é a conduta mais efetiva para prevenir doenças, do que os procedimentos baseados apenas em fatores de

risco, porque em aproximadamente metade dos casos de infecção neonatal as mães não tinham nenhum fator de risco (Rosenstein et al. **1997.**), assim como 18% dos partos têm culturas positivas para *S. agalactiae*, e não fatores de risco (Schrag, S.J. et al. **2002.**). É importante que a pesquisa de *S. agalactiae* seja feita no final da gestação (da 35^a a 37^a semana de gestação), de forma a aumentar a sensibilidade e especificidade do teste (CDC. **2010**). O índice de isolamento do microrganismo depende do tipo de meio de cultura utilizado e dos sítios anatómicos a partir dos quais são colhidas as amostras (Ortiz,M.P.C. & Vélez, J.D.C. **1996**).

O estado colonização por *S. agalactiae* deve ser determinado através da recolha de amostras, tanto vaginal e retal, entre a 35^a – 37^asemanas de gestação. Um único esfregaço vaginal-retal pode ser colhido na mesma zaragatoa. Assim que se proceda a inoculação do microrganismo, esta deve ser feita usando um meio de enriquecimento, como o meio de Todd-Hewitt (contém gentamicina e ácido nalidíxico, que são agentes antimicrobianos, que tornam este meio selectivo, não permitindo o crescimento de certos microrganismos) ou meio de LIM (meio de Todd-Hewit suplementado com antibióticos), deixando-se a incubar 18-24 horas. De seguida, CDC recomenda, uma subcultura em meio de gelose de sangue, onde devem ser valorizadas as colónias β – hemolíticas (CDC.**2010.**). Contudo este procedimento requer mais de 48 horas para estar completo, mas resultados precisos são mais importantes do que um tempo de resposta rápido de triagem (Bou, G., Figueira, M., Canle, D., Cartelle, M., Eiros, J.M., & Villanueva, R. **2005**; CDC.**2010.**).

A não utilização de meio enriquecido e seletivo para inibir o crescimento da flora normal, pode levar à não identificação de até 50% das portadoras de *S. agalactiae* (Ortiz,M.P.C. & Vélez, J.D.C. **1996.**). Nos últimos anos, alterações ao meio de Islam, primeiramente descrito em 1997, foram testadas para avaliar a sua aptidão para detetar e isolar *S. agalactiae*. Esses meios modificados, incluem o meio de Granada (MG), em que estirpes de *S. agalactiae* que são β – hemolíticas, produzem colónias cor de laranja a salmão, permitindo assim a identificação das colónias de *S. agalactiae*, em uma única etapa. Este meio tem uma sensibilidade > 90% para a deteção de *S. agalactiae*,

embora tenham havido relatos de uma menor sensibilidade que pode ser explicada por más condições de armazenamento no laboratório ou durante o transporte (Bou, G., Figueira, M., Canle, D., Cartelle, M., Eiros, J.M., & Villanueva, R. **2005.**).

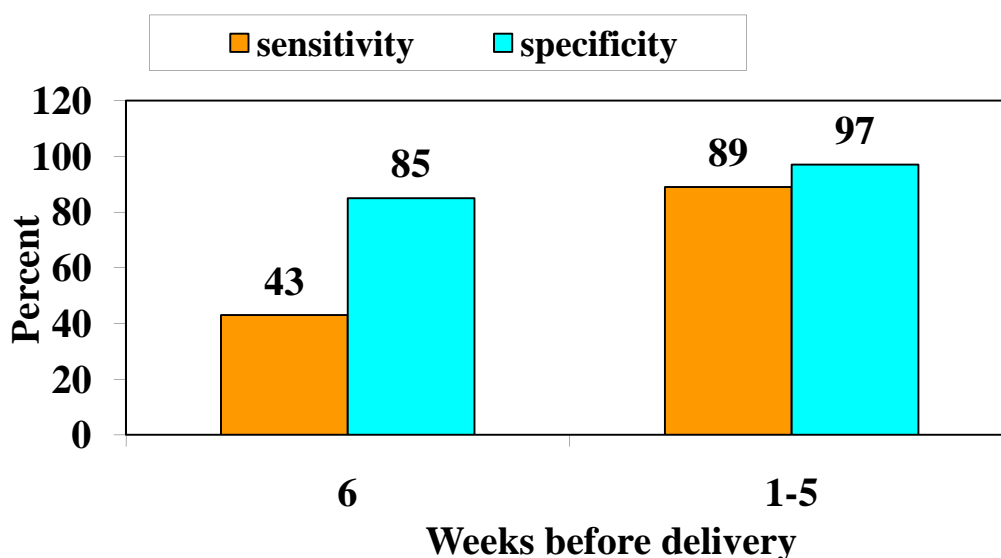


Figura 9: Gráfico representativo do aumento da sensibilidade e especificidade das técnicas de cultura mediante a proximidade do parto. (esquema retirado de www.cdc.gov/microbiologyslides_Feb2003 em 18 de Julho de 2012).

Contudo, a ocorrência de não pigmentação (1-3%) das estirpes de *S. agalactiae*, bem como o possível encobrimento dessas estirpes pela cor laranja, no meio de Granada, das colónias de bactérias da flora normal que coloniza a vagina, fazem com que se pense em procedimentos alternativos (Bou, G., Figueira, M., Canle, D., Cartelle, M., Eiros, J.M., & Villanueva, R. **2005.**). O meio Agar Diferencial para *Streptococcus* do grupo B é uma modificação do novo meio de Granada com uma melhor estabilidade e sensibilidade. As colónias de *S. agalactiae* aparecem neste meio com uma coloração roxa, o que torna mais rápida a identificação da bactéria (Bou, G., Figueira, M., Canle, D., Cartelle, M., Eiros, J.M., & Villanueva, R. **2005.**).

A detecção do *S. agalactiae* de acordo com o preconizado pelo CDC, tem-se mostrado eficiente, contudo com algumas limitações: nem todas as gestantes efetuam o controle pré-natal adequado e a cultura é um método demorado de detecção que não garante o resultado no momento do parto, principalmente quando este é prematuro. Para superar essa falha no diagnóstico, tem se tornado necessária a implementação de testes rápidos para a detecção de *S. agalactiae* (Pereira, P.P., Lautenschlager, M.A.C., Maganha, C.A., Armelin, A.R. & Zugaib, M. **2002.**).

Um teste rápido adequado para utilização intra-parto deve ser tão sensível como o método de cultura, tão rápido que os resultados estejam disponíveis a tempo do médico administrar os antibióticos antes do parto, e conveniente para a integração na rotina laboratorial (CDC.**2002.**). Um teste rápido intra-parto possuindo os atributos descritos acima oferece a vantagem de conhecer o estado de colonização antes do parto entre as mulheres que não tiveram atendimento pré-natal (CDC.**2010.**). Num estudo de 112 mulheres grávidas num hospital universitário localizado em Quebec, uma nova técnica, fluorogenic PCR foi testada e verificou-se uma sensibilidade de 97% e uma especificidade de 100%, quando comparado com os resultados de culturas vaginais e retais. Os resultados dos testes, neste estudo estavam disponíveis em 45 minutos após a colheita da amostra. Mais estudos são necessários para determinar se este tipo de teste pode ser adaptado para uso na rotina laboratorial (CDC. **2002.**).

Vários outros métodos também têm sido avaliados, com essa finalidade, como a aglutinação em látex, imunoensaios enzimáticos e hibridação com sondas de DNA, com resultados definitivos entre 15 minutos a 4 horas. Apesar de muito específicos nenhum desses testes apresentou sensibilidade comparável à cultura, já que detetam com segurança casos de colonização maciça, mas não aqueles em que a contaminação é discreta (Pereira, P.P., Lautenschlager, M.A.C., Maganha, C.A., Armelin, A.R. & Zugaib, M. **2002.**).

Apesar das estratégias recomendadas pelo CDC para a prevenção da doença neonatal precoce por *S. agalactiae*, muitas instituições de saúde seguem esquemas próprios ou não utilizam nenhum tipo de protocolo de

prevenção, pondo em risco a saúde das crianças (Gosling, I.A., Stone, P.R. & Grimwood, K. **2002**).

7.3 Estratégias De Prevenção

Quase metade dos casos de doença invasiva por *S. agalactiae* ocorre em recém-nascidos, por conseguinte, os esforços de prevenção da doença por este agente têm sido concentrados neste grupo. As pesquisas centraram-se em duas vertentes: a indução de imunidade no recém-nascido (imunização passiva ou ativa) ou a erradicação da colonização materna e/ou do recém-nascido (quimioprofilaxia) (CDC.**1996**).

7.3.1 Vacina Contra *Streptococcus agalactiae*

Toda a problemática derivada do tratamento profilático antibiótico, potenciou a alternativa de criar uma vacina. Acredita-se que o desenvolvimento de uma vacina específica contra o *S. agalactiae* seja a única solução efetiva na prevenção dessa infecção tão importante, prevalente e letal nos recém-nascidos, além de minimizar o impacto da resistência bacteriana desse microrganismo e possivelmente evitar óbito fetal e prematuridade relacionadas com esse agente patogénico (Silva, L.J.; Richtmann, R.**2006**).

As primeiras **vacinas polissacarídicas** foram baseadas na indução de anticorpos específicos contra os polissacarídeos capsulares. A atuação precoce dos macrófagos e polimorfonucleares irá determinar a evolução da infecção, uma vez que o *S. agalactiae* impede a fagocitose se não existirem anticorpos opsonizantes e não se ativa o sistema complemento. Os anticorpos contra os polissacarídeos capsulares fazem a opsonização da bactéria induzindo a fagocitose desta e são, portanto, protetores, apesar de serem específicos para um tipo e não terem efeito heterólogo, o que obrigaria a incorporar cada um dos polissacarídeos desejados numa vacina polivalente (López, J.G.S., Teres, F.O. **2004**.)

No entanto a imunidade causada exclusivamente pelos polissacarídeos é subótima e de curta duração. A presença de anticorpos induzidos, desta forma, seja naturalmente presente ou de origem vacinal, originados a nível das mucosas, podem conduzir a uma “tolerância imunológica”, em que sucessivos contactos posteriores com o antígeno não são seguidos do desejado aumento imediato dos níveis de anticorpos protetores, provavelmente alterando a distribuição das subclasses de IgG e resultando numa redução da capacidade de opsonização. Isso, segundo alguns autores, também pode ocorrer após a primeira vacinação com vacinas conjugadas, que podem conter qualquer quantidade de polissacarídeo capsular livre (López, J.G.S., Teres, F.O. **2004.**).

Para provocar uma resposta imunitária dependente das células T intensa e prolongada com efeito de memória, foi testado a conjugação de cada polissacarídeo a uma proteína transportadora, o que constitui as **vacinas conjugadas**. Para fazer isso, em princípio, têm sido utilizados principalmente o toxóide tetânico (mesmo em seres humanos, pela conhecida segurança de administração até em grávidas) e uma toxina diftérica mutante atóxica – CRM197 -, que são atualmente utilizados na conjugação de outros polissacarídeos em vacinas comercializadas universalmente (*meningococcus*, *pneumococcus*). Estas duas proteínas transportadoras de eficácia comprovada, têm o inconveniente de que a sobreexposição por administração frequente e múltipla de vacinas que as contenham, poder afetar negativamente o efeito imune pretendido (López, J.G.S., Teres, F.O. **2004.**).

Em ensaios envolvendo adultos saudáveis, nas fases I e II, foram administradas vacinas conjugadas que incluíam os polissacarídeos Ia, Ib, II, III, V, VI e VII, sem efeitos adversos e originando anticorpos IgG tipo-específicos após duas semanas da primeira dose, com concentrações máximas entre as 4-8 semanas. Os serótipos IV e VII conjugados, em animais de laboratório, também apresentam capacidade protetora por transferência transplacentária serótipo específica contra estirpes homólogas. Se não se conseguir nenhum tipo de reacção cruzada, o que não ocorre entre polissacarídeos capsulares (nem sequer entre os isómeros estruturais Ia e Ib), a vacina terá de conter, pelo menos, todos os serótipos predominantes numa dada população para que possa ser utilizada com intenção profilática.

Com efeito, para prevenir o surgimento e o efeito de substituição, numa população vacinada, de serótipos ausentes na vacina, seria prudente incluir todos os serótipos na vacina (López, J.G.S., Teres, F.O. **2004.**).

A proteína transportadora ideal seria a que permitisse a conjugação do maior número de polissacarídeos distintos, com a mínima quantidade possível de proteína, cuja estrutura não deve apresentar semelhanças com as proteínas humanas, para evitar potenciais fenómenos autoimunes (López, J.G.S., Teres, F.O. **2004.**).

A existência de imunidade prévia aos componentes da vacina pode, ocasionalmente, ter um efeito potenciador ou supressor da resposta imune, imprevisível para cada sujeito, sendo já por si difícil saber se já houve contatos anteriores com o microrganismo e se estes criaram algum tipo de imunidade anterior à administração da vacina. Isto não parece suceder quando a imunidade inicial foi induzida por uma vacina conjugada (López, J.G.S., Teres, F.O. **2004.**).

Ao contrário das crianças, há poucos estudos de administração de vacinas conjugadas em adultos e, menos ainda, de doses sucessivas. Neste sentido, já foi testada uma vacina que incluiu adjuvantes, que estimulam a resposta imunitária, evitando assim a administração de doses de reforço e permitindo diminuir a dose dos componentes da vacina, sobretudo da proteína transportadora cujas concentrações poderiam ser proibidas em vacinas polivalentes. Inesperadamente, em alguns ensaios neste sentido, a adsorção em hidróxido de alumínio (do qual há uma grande experiência prévia) não aumentou a capacidade imunológica da vacina estudada, talvez por uma tolerância a este adjuvante amplamente utilizado (López, J.G.S., Teres, F.O. **2004.**).

A fim de melhorar a composição das vacinas conjugadas, tornou-se muito sugestivo a possibilidade de utilizar as proteínas da membrana externa do *S. agalactiae*, como antígenos por si próprias ou conjugadas com os polissacarídeos capsulares, tendo a vantagem técnica de que se podem obter em grande quantidade mediante recombinação de DNA (López, J.G.S., Teres, F.O. **2004.**).

Como nem todos os serótipos expressam a mesma proteína na sua cápsula (**Tabela 3**), nem na mesma proporção, um objectivo interessante seria formular um conjugado polissacarídeos/proteína de superfície de *S. agalactiae*, que abrangesse o máximo espectro de cobertura, permitindo prescindir de alguns polissacarídeos, tirando partido da imunogenicidade da proteína de superfície expressa por esses serótipos, e com a menor quantidade de proteína também beneficiar, se for o caso, da possibilidade de reações cruzadas heterólogas (López, J.G.S., Teres, F.O. **2004.**).

A imunogenicidade alcançada por estas vacinas potenciada por adjuvantes (entre os quais também poderiam utilizar-se as próprias proteínas externas do *S. agalactiae*) permite a sua aplicação em mucosas, como a mucosa nasal (o que supõem um avanço estratégico importantíssimo), remediando a contaminação natural e induzindo não só uma imunidade geral por anticorpos séricos do tipo IgG, que impediriam a invasão pelo microrganismo, como também uma protecção local muito importante mediada por IgA, evitando a colonização materna e portanto toda a possibilidade de infeção em qualquer período da gravidez ou do período perinatal, tanto para a mãe como para o neonato. Seria a vacina ideal (López, J.G.S., Teres, F.O. **2004.**).

Para além das conjugações dos distintos polissacarídeos com toxóide tetânico e CRM197, cuja administração intramuscular, normalmente em separado, já se demonstrou a sua eficácia em trabalhos experimentais em seres humanos, outras combinações estão a ser sugeridas, como as que se apresentam de seguida (López, J.G.S., Teres, F.O. **2004.**):

- Polissacarídeo capsular tipo III conjugado com toxóide tetânico (PCIII-TT), administrado por via intranasal ou subcutânea provoca uma importante reacção IgG sérica. Parece que a administração de uma segunda dose, 21 meses depois, não tem efeito de reforço em indivíduos que previamente tinham anticorpos anti-PCIII adquiridos por via natural, como se se produzisse uma “tolerância imunológica” (López, J.G.S., Teres, F.O. **2004.**)

- Polissacarídeos capsulares conjugados com uma subunidade recombinante da toxina colérica B (TCB). Parece que se a conjugação for feita por aminoredução o efeito é superior, sobretudo se se utilizar um conjugado de alto peso molecular. Está comprovado um importante efeito adjuvante em vacinas de distintos polissacarídeos conjugados a outras proteínas (de membrana do *S. agalactiae* ou outras) permitindo a sua administração por via intranasal com reações sistêmicas e locais duradouras. Parece, no entanto, que a maior protecção local se alcança na mucosa recetora da vacina, pelo que, do ponto de vista pediátrico, a via preferencial de administração seria a via vaginal, para protecção do neonato. Assim, parece preferível repartir a dose em três aplicações em dias seguidos. Foram testadas, as seguintes vacinas (López, J.G.S., Teres, F.O. **2004.**):
 - ✓ PCIII-TCB: importante protecção geral quando administrada por via intra-muscular ou subcutânea. Administrada por via intranasal, comprova-se níveis elevados de IgA e IgG no pulmão (López, J.G.S., Teres, F.O. **2004.**).
 - ✓ Combinada PCIII-PCIIa-TCB: mantêm-se a imunogenicidade e não há concorrência antigénica (López, J.G.S., Teres, F.O. **2004.**);
 - ✓ Biconjugada PCIII-TT (transportadora) – TBC (adjuvante): aumento dos níveis de IgG séricos, no pulmão e na vagina, além do aumento de IgA nas mucosas (López, J.G.S., Teres, F.O. **2004.**).

Uso do antígeno recombinante anti-hepatite B core do pato, como transportador dos diferentes polissacarídeos capsulares, tem-se mostrado eficaz. Igualmente, uma mutante atenuada enzimaticamente da toxina diftérica, distinta da “Cross reactive material 197” (CRM197), se tem utilizado para a conjugação (López, J.G.S., Teres, F.O. **2004.**).

- As microesferas biodegradáveis contendo PCIII e um potente adjuvante imunoestimulante sintético, administradas por via oral, intranasal, vaginal, intramuscular ou intraperitoneal provocam resposta imunológica sistêmica ou local (López, J.G.S., Teres, F.O. **2004.**).
- Quanto à utilização de proteínas de membrana externa do *S. agalactiae* (López, J.G.S., Teres, F.O. **2004.**):
 - ✓ Uma vacina de dois antígenos proteicos de membrana: Rib e Cx, proporciona uma eficácia de proteção de 80% contra os serótipos Ia, Ib, II e III, tanto combinada como administrada em separado. Não existe competição antígenoica, nem tão pouco reação cruzada heteróloga. Esta vacina também pode ser imunoativa contra o serótipo V, uma vez que as estirpes desse serótipo expressam Cx e uma proteína similar a Rib (López, J.G.S., Teres, F.O. **2004.**).
 - ✓ A C5a peptidase, expressa por praticamente todos os serótipos de *S. agalactiae* conhecidos até ao momento, induz por si mesma ou conjugada com uma proteína transportadora, uma resposta imunitária conferindo um nível de protecção independente do serótipo quando administrada por via subcutânea.
 - ✓ A proteína Sip induz, como antígeno único, protecção contra infeções por serótipos Ia, Ib, II, III, V e VI (López, J.G.S., Teres, F.O. **2004.**).
 - ✓ Uma proteína similar à R, expressa pelos serótipos Ia, II e V, induz imunoproteção frente a estirpes heterólogas. A inclusão de TCB como adjuvante, induz uma importante imunidade sistêmica e local, duradoura, quando administrada por via intranasal (López, J.G.S., Teres, F.O. **2004.**).

Proteínas Cx, C β e Rib, que embora mais tipoespecíficas, são expressas por vários serótipos e a proteína similar - R, R-4 (na maior parte das estirpes do serótipo III) e a R-3 (nas estirpes do serótipo V) quando se combinam com os polissacarídeos capsulares que não expressam estas proteínas de membrana, aumentam a gama antígenoica tipoespecífico, verificando-se, em alguns casos, um aumento da resposta imunológica, com a adição de adjuvantes, que, por

sua vez, também poderiam ser proteínas de membrana do *S. agalactiae* (López, J.G.S., Teres, F.O. **2004.**).

Se os estudos experimentais de todas estas vacinas são laboriosos e difíceis, a última demonstração da eficácia da vacina, exigirá ensaios clínicos com uma amostra excessivamente numerosa, assim como um estudo sobre o seu impacto sobre a colonização vaginal (López, J.G.S., Teres, F.O. **2004.**).

Além disso, qualquer programa de vacinação que exija a sua aplicação a grávidas, comporta potenciais problemas legais relacionados com o facto de que qualquer adversidade que surgisse seria imediatamente relacionada com a vacina. É por isso que a eleição seria vacinar jovens no início da sua fertilidade, que, apesar da dificuldade de conseguir ampla cobertura da população, evitaria litígios e os riscos associados à colonização por *S. agalactiae* antes do terceiro trimestre, a idade limite para começar a vacinação. Em contrapartida, esta estratégia exigiria uma persistência dos níveis de anticorpos para que se pudesse dar a transferência transplacentária, o que poderia exigir uma dose de reforço dificultando técnica e economicamente a aplicação da vacina, cuja resposta imune da dose de reforço não é bem conhecida (López, J.G.S., Teres, F.O. **2004.**).

Se considerarmos a necessidade de uma fórmula distinta para diferentes zonas geográficas, para diferentes idades e que se altere com o tempo, consoante as variações dos serótipos prevalentes e possíveis serótipos emergentes, que obrigariam a frequentes atualizações da composição da vacina, pode-se imaginar a quantidade de obstáculos que se teria de ultrapassar para se obter a tão desejada vacina que proteja todos os recém-nascidos da doença invasiva por *S.agalactiae* (López, J.G.S., Teres, F.O. **2004.**).

Tabela 4: Proteínas de membrana e serótipos de *Streptococcus agalactiae*. (Retirada de: López, J.G.S., Teres, F.O. **2004**.).

Proteína de Membrana		Serótipos							
		Ia	Ib	II	III	IV	V	VI	VII
C		~100%	~100%	~50%	< 5%	~100%			
R	4				92%				
	3						84%		
R-like		X		X			X		
Rib- like							X		
Sip		X	X	X	X		X	X	
a-like							X		
C5a peptidase		Praticamente todos. Reações cruzadas heterólogas							

7.3.2 Profilaxia Antibiótica Intra-parto

O uso da profilaxia intraparto intravenosa de antibióticos para evitar a doença de início precoce por *S. agalactiae* foi estudada pela primeira vez na década de 1980. Os ensaios clínicos bem desenhados e estudos observacionais, revelaram que a profilaxia intra-parto com antibióticos reduziu a transmissão vertical do *S. agalactiae*, medida pela colonização infantil ou por proteção contra a doença de início precoce. Testes iniciais sugerem uma eficácia de 100% da profilaxia antibiótica intra-parto, para evitar a DNIP em crianças nascidas de mães colonizadas (CDC.**2010**).

Outras estratégias para reduzir a colonização materna e transmissão vertical foram estudadas, incluindo a administração intramuscular durante o trabalho de parto do antibiótico, administração oral ou intramuscular de antibióticos no período pré-natal, ou administração vaginal de clorexidina. No entanto, nenhum provou ser eficaz na prevenção da doença de início

precoce. Apesar de alguns estudos não randomizados sobre clorexidina apresentarem resultados promissores, ensaios clínicos randomizados não encontraram nenhuma proteção contra doença de início precoce por *S. agalactiae* ou sepse neonatal (CDC.2010).

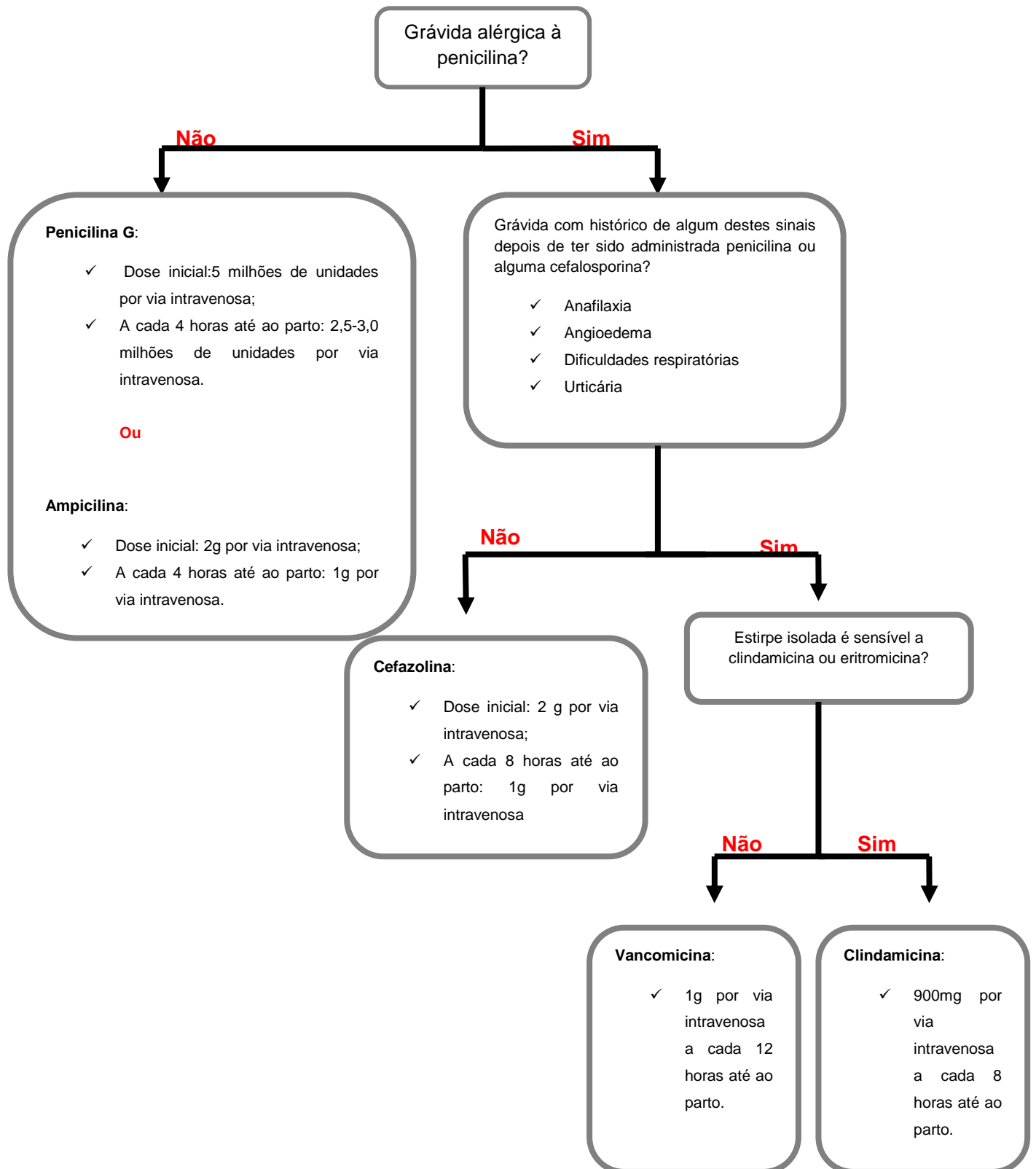
De acordo com a diretrizes do CDC (2010) a profilaxia intra-parto para o *S. agalactiae* deverá ser feita recorrendo à penicilina ou à ampicilina, embora a cefazolina seja aconselhada no caso de mulheres alérgicas à penicilina que apresentem um baixo risco de anafilaxia. A penicilina continua o antibiótico de eleição, uma vez que esta estirpe é, salvo raras exceções, uniformemente susceptível à penicilina (CDC.2010.).

No caso em que as mulheres apresentam elevado risco de desenvolver reação alérgica deverá optar-se por recorrer à eritromicina ou à clindamicina. É de salientar, que quando o *S. agalactiae* for isolado de mulheres com alergia severa à penicilina, a clindamicina e a eritromicina deverão ser testadas e os resultados reportados ao clínico para que haja uma adequação da terapêutica a instituir à gestante, uma vez que já foram revelados estudos que demonstram um aumento da resistência desta estirpe a estes antibióticos (CDC.2010.).

A definição de alto risco de anafilaxia, é estabelecido tendo em conta se há histórico de anafilaxia, angioedema, dificuldades respiratórias e urticária após a administração de uma penicilina ou uma cefalosporina (CDC.2010.).

O regime de dosagem recomendada de penicilina G é de 5 milhões de unidades por via intravenosa, seguido de 2,5-3,0 milhões de unidades por via intravenosa a cada 4 horas. O intervalo de 2,5 - 3,0 milhões de unidades é recomendado para atingir níveis adequados do antibiótico na circulação fetal e fluido amniótico, evitando neurotoxicidade (CDC.2010.).

A eritromicina não é mais uma alternativa aceitável para profilaxia antibiótica intra-parto para mulheres alérgicas à penicilina (CDC.2010.).



Fluxograma 1: Regimes de Profilaxia antibiotica intra-parto recomendados para prevenção de DNIP por *S. agalactiae*. (Imagem retirada de: http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5910a1.htm?s_cid=rr5910a1_w#Box3; em 24/09/2012.

7.4 Efeitos Adversos e Consequências Imprevistas da Profilaxia Antibiótica Intra-parto

Os potenciais efeitos adversos ou involuntários dos esforços de prevenção da doença por *S. agalactiae*, que têm suscitado preocupação incluem reações alérgicas ou anafiláticas a agentes usados para a PAIP, o aparecimento de estirpes de *S. agalactiae* resistentes a terapêuticas padrão, e aumento da incidência de infecção neonatal grave causada por outros agentes patogênicos que não o *S. agalactiae*, incluindo estirpes resistentes a antibióticos. Devido ao crescente aparecimento de resistência bacteriana aos antibióticos em meio hospitalar e na comunidade, a avaliação do impacto e eficácia das intervenções baseada na profilaxia antibiótica é crítica (CDC.2002.).

7.4.1 Alergia a Antibióticos, incluindo Anafilaxia

Anafilaxia associada com a profilaxia para *S. agalactiae* ocorre, mas é suficientemente raro, e qualquer morbidade associada a anafilaxia é amplamente compensada pela redução na incidência de doença invasiva por *S. agalactiae* materna ou neonatal (CDC. 2002.).

A taxa de anafilaxia causada por penicilina está estimada como sendo, entre 4 / 10000 a 4 / 100000 mulheres que recebem PAIP. Além disso, mais de 10% da população adulta têm reações alérgicas menos graves à penicilina (CDC. 2002.).

7.4.2 Resistência a Antibióticos

A resistência aos antibióticos ocorre quando estes perdem a capacidade de controlar o crescimento ou morte bacteriana; ou seja, é a forma que as bactérias encontram para neutralizar o efeito do antibiótico. Assim, uma bactéria é considerada resistente a determinado antibiótico quando continua a multiplicar-se na presença de níveis terapêuticos desse antibiótico.

Quando se considera o problema do aumento das resistências bacterianas a antibióticos num ambiente em que são utilizados agentes potentes, convém lembrar que a resistência não é uma situação nova.

A espécie *S. agalactiae* é conhecidamente resistente à gentamicina e ao ácido nalidixico e sensível à penicilina (Fitoussi, F., Loukil, C., Gros, I., Clermont, O., Mariani, P., Bonacrosi, S. et al. **2001.**), embora as concentrações inibitórias mínimas da penicilina sejam mais elevadas do que aquelas necessárias para outras espécies do género *Streptococcus* (Ortiz, M.P.C. & Vélez, J.D.C. **1996.**). Estudos de susceptibilidade a antibióticos, confirmaram que a resistência a penicilina ou ampicilina não foram observadas (CDC. **2010.**).

Por isso, a penicilina continua a ser o antibiótico de escolha para a PAIP. A ampicilina é uma alternativa aceitável, mas a penicilina é preferida porque tem um espectro de atividade antimicrobiana mais restrito e pode ser menos provável a seleção de organismos resistentes. A eficácia dos dois antibióticos (penicilina e ampicilina) administrados durante o parto, como agentes para a prevenção do aparecimento de doença neonatal precoce por *S. agalactiae*, tem sido demonstrada em ensaios clínicos (CDC. **2010.**).

A tetraciclina apresenta um amplo espectro de atividade, toxicidade e custos relativamente baixos, razão pela qual, na década de 70, foi bastante utilizada no tratamento de infeções em seres humanos e animais. Hoje o seu uso é restrito em decorrência do aparecimento de resistências. Em espécies do género *Streptococcus*, foram descritos mecanismos de efluxo ativo do antibiótico e de proteção ribossómica, codificados por diferentes **genes tet** (Chopra, I. & Roberts, M. **2001.**). Segundo dados da literatura, a grande maioria das amostras de *S. agalactiae* apresenta resistência ou sensibilidade intermédia a este antibiótico, razão pela qual é desaconselhado o uso profilático deste antibiótico (Fernandez, M., Hickman, M. E. & Baker, C.J. **1998.**).

A eritromicina e a clindamicina são recomendadas como agentes profiláticos das doenças do neonato por *S. agalactiae* em mulheres alérgicas à penicilina, porém estudos têm demonstrado o aparecimento de estirpes resistentes a ambos os antibióticos.

A prevalência de resistências, entre estirpes de *S. agalactiae* isoladas nos Estados Unidos e Canadá, variou de 7% a 25% para a eritromicina, e de 3% a 15% para a clindamicina, segundo relatórios publicados entre 1998 e 2001 (CDC. **2002.**). A resistência à eritromicina é frequentemente, mas nem sempre associada à resistência à clindamicina (CDC. **2002.**).

Em *S. agalactiae*, a resistência à eritromicina está principalmente associada a dois mecanismos: modificação do local alvo e efluxo ativo do antibiótico. O primeiro é mediado por uma metilase, codificada pelos genes *ermA* e *ermB*. Esta enzima adiciona dois grupos metil a um resíduo de adenina do rRNA 23S, o que provoca alterações conformacionais no ribossoma, levando a uma diminuição da ligação de macrolídeos, lincosamídeos e estreptograminas B (os quais, embora quimicamente distintos, apresentam mecanismos de ação semelhantes e sítios alvo sobrepostos), este fenótipo de resistência é denominado MLS_B (macrolídeos, lincosamídeos e estreptograminas B). O efluxo ativo do antibiótico, que mantém os níveis intracelulares de eritromicina baixos, é resultado da síntese de uma bomba de efluxo dependente de energia. Tal resistência está associada à expressão de um gene descrito como *mefA*. As amostras que possuem esse gene apresentam o fenótipo M, representativo de resistência apenas a macrolídeos, tendo suscetibilidade a lincosamídeos (clindamicina) e streptograminas B (Roberts, M.C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L.B., Rood, J. & Seppala, H. **1999.**; De Azavedo, J.C.S., McGavin, M., Duncan, C., Low, D.E. & Megeer A. **2001.**; Fitoussi, F., Loukil, C., Gros, I., Clermont, O., Mariani, P., Bonacrosi, S. et al. **2001.**).

A resistência à clindamicina com sensibilidade à eritromicina está associada ao gene *linB*, anteriormente identificado em *Enterococcus faecium*, que codifica uma nucleotidiltransferase que inativa o antibiótico por adenilação (Bozdogan, B., Berrezouga, L., Kuo, M.S., Yurek, D.A., Farley, K.A., Stockman, B.J. & Leclecq, R. **1999.**; De Azavedo, J.C.S., McGavin, M., Duncan, C., Low, D.E. & Megeer A. **2001.**). O serótipo V tem sido o mais encontrado como predominante entre as amostras resistentes à eritromicina (Croak, A., Abate,

G., Goodrum, K. & Modrzakowski, M. **2003.**; Grimwood, K., Stone, P.R., Gosling, I.A., Grenn, R., Darlow, B.A., Lennon, D.R & Martin, D.R. **2002.**).

Isolados de *S. agalactiae* resistentes à cefoxitina, uma cefalosporina de segunda geração de largo espectro de ação, utilizado para mulheres com coriamnionites, também têm sido descritos (CDC.**2002.**).

7.4.3 Aumento da Incidência de Outros Patógenos Resistentes a antibióticos que não *S. agalactiae*

Diminuições na incidência de sepsis precoce por *S. agalactiae* - não têm sido geralmente acompanhadas por aumentos na incidência de sepsis de início precoce causada por outros agentes patogênicos, incluindo os que são resistentes aos antibióticos. A maioria dos estudos, incluindo estudos de base populacional, multicêntricos, encontraram estável ou a diminuir as taxas de sepsis de início precoce causada por outros agentes que não *S. agalactiae* durante um período de aumento da utilização da PAIP para *S. agalactiae*. Isto é válido tanto para sepsis causada por todos os outros microrganismos que não *S. agalactiae* e sepsis neonatal causada por *Escherichia coli*, a segunda causa bacteriana mais importante de sepsis neonatal, após *S. agalactiae*. Apenas em estudos num único hospital, verificou-se o aumento das taxas de sepsis neonatal causada por *E. coli*, microrganismos Gram-negativos em geral, ou resistentes à ampicilina, mas estes aumentos parecem estar limitados a prematuros ou bebês de baixo peso ao nascimento. Uma proporção crescente de sepsis neonatal causada por estirpes de *E.coli* resistentes à ampicilina, foi observado em dois estudos, mas novamente foi limitada à prematuridade ou baixo peso à nascença. Além disso, a proporção de infecções por *E. coli* adquirida na comunidade que são resistentes à ampicilina tem vindo a aumentar, sugerindo que as tendências da resistência antimicrobiana não devem ser atribuída a profilaxia para *S. agalactiae* (CDC. **2002.**).

Uma associação entre exposição intraparto ao antibiótico e casos de sepsis precoce por *E. coli* ou outros microrganismos que não o *S. agalactiae* resistentes à ampicilina, tem sido observado em vários estudos.

Estes relatórios estabelecem que infecções causadas por organismos resistentes aos antibióticos foram mais frequentemente precedidas do uso do antibiótico do que infecções causadas por organismos sensíveis, e que o período mais longo da administração do antibiótico ou doses mais elevadas antes do parto aumentam a probabilidade de ocorrer infecção neonatal, e se ocorrer, de ser causada por um organismo resistente aos antibióticos. Esses estudos, no entanto, não foram concebidos para avaliar se utilizar antibióticos intraparto aumenta a taxa de infecções por microrganismos resistentes aos antibióticos. Além disso, as conclusões a partir destes estudos são consistentes com a teoria de que o uso de antibióticos intraparto induz a resistência aos antibióticos, entre os organismos inicialmente sensíveis, mas também com a ideia de que o uso de antibióticos intraparto previne infecções causadas por microrganismos suscetíveis aos antibióticos e não tem qualquer impacto sobre infecções causadas por microrganismos resistentes aos antibióticos, resultando uma redução no total da taxa de infecção (CDC. **2002.**).

Os aumentos descritos da infecção precoce causada por microrganismos resistentes aos antibióticos em alguns estudos não são de magnitude suficiente para superarem os benefícios da PAIP na prevenção de doenças perinatais por *S. agalactiae*. No entanto, para assegurar a detecção precoce de aumentos na taxa de incidência e mortalidade por doença causada por outros microrganismos que não o *S. agalactiae*, uma vigilância da sepsis neonatal causada por outros organismos que não *S. agalactiae* continua a ser necessária (CDC. **2002.**).

8. Justificação do Estudo

Streptococcus β – hemolítico do grupo B ou *S. agalactiae* é uma das principais causas de infeções neonatais graves. A maioria das infeções neonatais podem ser prevenidas usando a profilaxia antibiótica intraparto em mulheres colonizadas por esta bactéria e que têm um risco aumentado de transmiti-la aos seus bebés. No entanto, apesar dos ensaios clínicos que demonstram a efetividade da profilaxia antibiótica intraparto, as estratégias de prevenção não foram amplamente e consistentemente implementadas, e a incidência da doença neonatal por este agente não diminui.

Numa sociedade desenvolvida tecnologicamente, com o uso cada vez mais frequente de antibióticos para tratamento de outras infeções, surge o aparecimento de estirpes resistentes a certos antibióticos. O mesmo acontece com esta bactéria que por ser parte da flora normal do trato gastrointestinal do Homem pode desenvolver resistência a antibióticos utilizados para tratamento de infeções. Por esta razão julgo ser importante determinar a resistência desta bactéria aos macrólidos, grupo de antibióticos de eleição na quimioprofilaxia intraparto em mulheres colonizadas por *S. agalactiae* no momento do parto que sejam alérgicas à penicilina, para se fazer uma escolha cada vez mais segura, tendo em conta a evolução genética da bactéria.

Julgo que a realização deste trabalho, será útil para a promover uma coordenada aplicação das medidas preventivas definidas pelo Centers for Disease Control (CDC), para uma diminuição das taxas de infeção perinatal de início precoce e tardio, sendo este um esforço que tem de ser desenvolvido por profissionais de saúde, investigando e informando a população em idade fértil da importância da realização do rastreio no tempo certo, para uma aplicação cada vez mais controlada e específica da quimioprofilaxia, a fim de evitar o aparecimento de novas estirpes cada vez mais patogénicas e com maior resistência aos antibióticos disponíveis no mercado.

9. Objetivos

Constituem objetivos específicos desta investigação:

- I. Estudar a prevalência de *S. agalactiae* em grávidas saudáveis que recorreram ao laboratório de patologia clínica Hilário de Lima em Braga;
- II. Estudar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, de acordo com as orientações da CLSI mas com adequação à realidade da rotina laboratorial;
- III. Verificar possíveis alterações nos padrões de suscetibilidade aos antimicrobianos usados;
- IV. Estudar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos apresentado de estirpes provenientes de gestantes que recorreram ao hospital de Santo António, no Porto.
- V. Avaliar se existem diferenças entre o perfil de suscetibilidade apresentado pelas estirpes isoladas de gestantes que recorreram ao ambulatório e as estirpes de gestantes acompanhadas em meio hospitalar,
- VI. Determinar os fenótipos de resistência aos macrólidos, lincosamidas e estreptograminas B (MLS_B).

10. Material e Métodos

10.1 População e Amostra

A amostra populacional deste estudo corresponde ao número de rastreios de *S. agalactiae* a mulheres grávidas durante o período de tempo compreendido entre 1 de Julho e 31 de Agosto de 2012, realizados no Laboratório de Patologia Clínica Hilário de Lima, em Braga. Foram realizados, neste período, 212 rastreios dos quais 34 foram positivos.

As amostras colhidas preferencialmente às grávidas entre a 35^a e 37^a semanas de gestação deverão ser de exsudado vaginal e retal: uma zaragatoa do terço inferior da vagina e uma zaragatoa da ampola retal. Não se recomendam culturas cervicais e não deverá ser utilizado espéculo.

As amostras colhidas às pacientes pelo clínico chegaram ao laboratório em meio enriquecido selectivo (Todd-Hewitt) no dia da colheita tendo sido processadas de acordo com os procedimentos de microbiologia descritos para o efeito no Serviço. O procedimento é obrigatório e realizado rotineiramente no laboratório.

Para o desenvolvimento deste estudo, o projeto foi submetido a Direção do Laboratório de Patologia Clínica Hilário de Lima.

Foram, também, incluídos neste estudo 39 isolados de *Streptococcus agalactiae* de gestantes em acompanhamento pré-natal no Hospital de Santo António, no Porto, para ser determinado o fenótipo de resistência a macrólidos. Estes isolados foram escolhidos aleatoriamente dentro dos rastreios positivos para esta bactéria.

10.2 Processamento das Amostras

As amostras colhidas, zaragatoa(s) vaginal e/ou retal, são inoculadas imediatamente após a colheita em meio de Todd-Hewitt (referência 42 116 da bioMérieux®) e enviadas ao laboratório.

Aqui, após o registo informático, são incubadas na estufa a 37°C durante 18-24 horas, período após o qual é realizada a repicagem para meio ChromoIDStrep da (referência 43 461 da bioMérieux®) que incuba 18-24 horas a 37°C. Se após as 24 horas de incubação não forem visíveis colónias de cor vermelho, a placa é levada a reincubar por mais 24 horas, ao fim das quais, o resultado é reportado como negativo. Se ao fim de 24 horas aparecerem colónias de cor vermelha, procede-se ao isolamento de uma colónia para se proceder à identificação e ao antibiograma da estirpe encontrada. O esquema de processamento da amostra laboratorialmente está descrito na imagem 10.

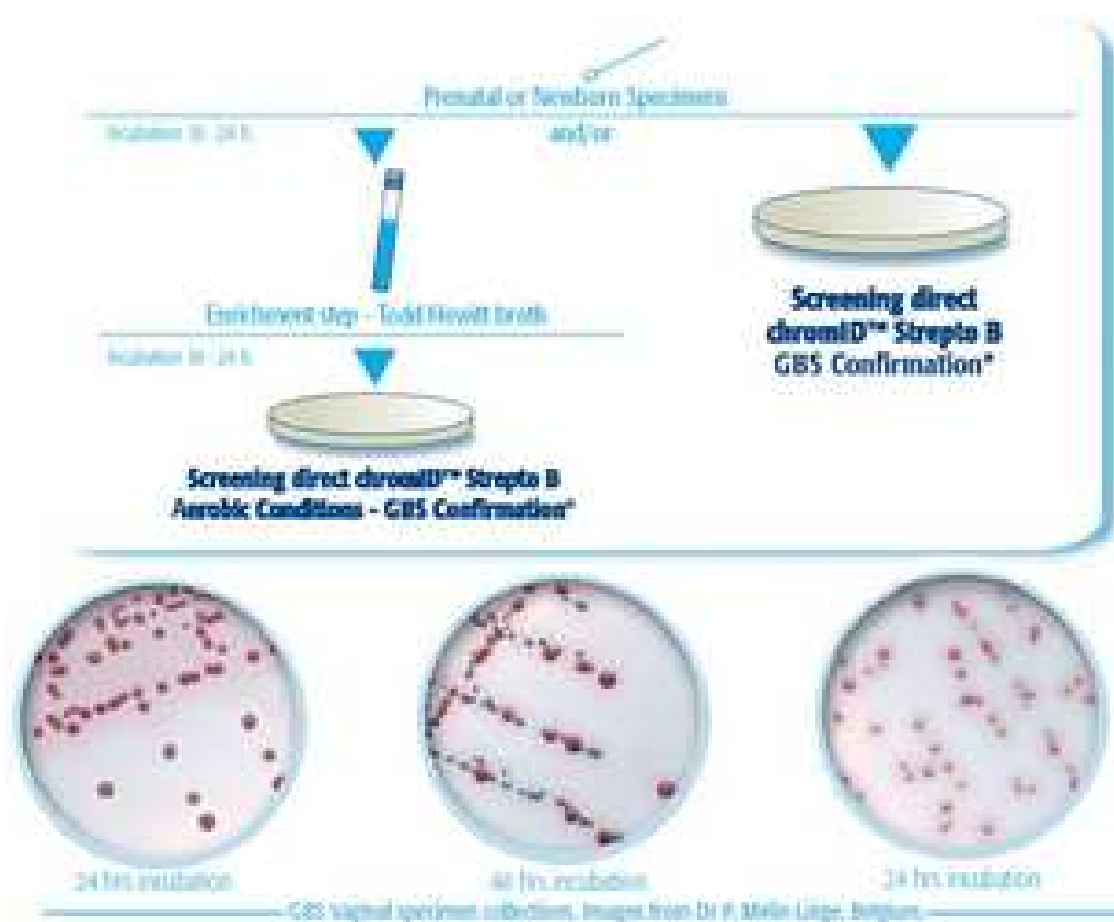


Figura 10: Procedimento de inoculação das amostras vaginais e rectais para identificação presuntiva de *Streptococcus agalactiae*. (imagem retirada de: http://www.biomerieux-diagnostics.com/servlet/srt/bio/clinical-diagnostics/dynPage?open=CNL_CLN_PRD&doc=CNL_PRD_CPL_G_PRD_CLN_21&pubparams.sform=9&lang=en; a 27/09/2012.

10.3 Testes Realizados

Quando se utiliza o meio ChromoIDStrepn (referência 43 461 da bioMérieux®) sabe-se que as colônias vermelhas, são colônias de *S. agalactiae*. Mas para uma maior garantia da seleção da estirpe certa, faz-se uma confirmação do grupo de Lancefield, utilizando o kit Slidex Strepto B (referência 58 816 da bioMérieux®), segundo as recomendações do fabricante. Resumidamente, uma suspensão de duas a três colônias de cada uma das estirpes, identificadas presuntivamente como *S. agalactiae*, foram adicionadas a 0,4 ml da enzima de extração. Numa

lâmina de microscopia ou nos próprios cartões de reação fornecidos pelo Kit, foi misturada uma gota da suspensão de partículas de látex sensibilizadas com anticorpos anti-estreptococos grupo B com uma gota do extrato bacteriano (colônias expostas à enzima de extração). Essa mistura foi agitada por dois minutos por meio de movimentos rotativos. O resultado foi considerado positivo quando houve o aparecimento de aglutinação das partículas de látex em até dois minutos (Figura 11) e negativo, quando houve ausência de aglutinação e suspensão homogênea.

As colônias que se confirmarem ser de *S. agalactiae*, são estudadas quanto ao seu perfil de suscetibilidade a antibióticos. O antibiograma foi feito pelo sistema automático Vitek Compact 2 (referência 27660 da bioMérieux®).



Figura 11: Reacção de aglutinação com Slidex Strepto B da **bioMérieux®** (imagem retirada de: http://www.biomerieux.fr/servlet/srt/bio/france/dynPage?open=FRN_CLN_PRD&doc=FRN_CLN_PRD_G_PRD_CLN_56&pubparams.sform=4&lang=fr; a 01/10/2012.

Para a realização dos antibiogramas, foram preparados dois tubos com 3,5 ml de soro fisiológico para cada estirpe. No primeiro tubo preparou-se uma suspensão bacteriana a 0.5 McF. Depois retira-se uma amostra para o outro tubo, e este tubo é colocado no aparelho, que por vácuo, faz o enchimento da carta de antibióticos, a sela e a incuba. A carta utilizada foi a AST 586 (referência 22 276 da bioMérieux®). Esta carta apresenta os antibióticos indicados para os

Streptococcus, incluindo a penicilina, a clindamicina e a eritromicina, que são os fármacos indicados na profilaxia antibiótica intra-parto.

Para a determinação dos fenótipos de resistência à eritromicina foi utilizada uma metodologia semelhante à do método de difusão em agar, através da sementeira de suspensões do inóculo em placas de Petri com meio de agar Mueller-Hinton contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro (referência 43 321 da



bioMérieux®). Dois discos comerciais de eritromicina (15 µg)

e clindamicina (2 µg) foram então colocados sobre a placa inoculada (separados por 12 mm), como descrito anteriormente (Arvand *et al.*, 2000). As placas foram

Figura 12: Aparelho Vitek Compact 2 da bioMérieux® (imagem retirada de: http://www.biomerieux.fr/servlet/srt/bio/france/dynPage?oplen=FRN_CLN_PRD&doc=FRN_CLN_PRD_G_PRD_CLN_56&pubparams.sform=4&lang=fr; a 01/10/2012.

incubadas a 35°C em atmosfera ambiente. Após 24 h, as placas foram observadas quanto ao aspeto do halo de inibição do crescimento bacteriano ao redor da clindamicina. A resistência tanto à eritromicina como à clindamicina caracteriza o fenótipo MLSB constitutivo (denominado cMLSB), indicando a produção contínua da enzima metilase. A redução do halo de inibição do crescimento bacteriano ao redor do disco de clindamicina na região próxima ao disco de eritromicina caracteriza o fenótipo MLSB indutivo (denominado iMLSB); neste caso a redução do halo de inibição é resultado da indução da resistência à clindamicina, exercida pela eritromicina difundida no meio de cultura. A sensibilidade à clindamicina caracteriza o fenótipo M (resistência apenas aos macrólidos) (Wu *et al.*, 1997; De Moouy *et al.*, 2001).

11. Resultados

11.1 Isolamento de *S. agalactiae*

A detecção da colonização por *S. agalactiae* em mulheres grávidas é importante devido às complicações ginecológicas/obstétricas que podem ser provocadas por este microrganismo. É frequente a colonização da vagina por *S. agalactiae* a partir do reto e é desta zona que a bactéria migra ascendentemente até ao cérvix onde, por alteração do muco cervical, pode potenciar a infeção e conduzir a uma rutura prematura de membranas e consequente início prematuro do parto.

O *S. agalactiae* foi pesquisado em amostras vaginais e/retais com a seguinte distribuição:

Amostra	Frequência	Percentagem
Vaginal/retal	208	98,1
Vaginal	4	1,9

S. agalactiae foi isolado em 34 das 212 amostras realizadas no laboratório durante o período do estudo, resultando uma prevalência de colonização de 16%.

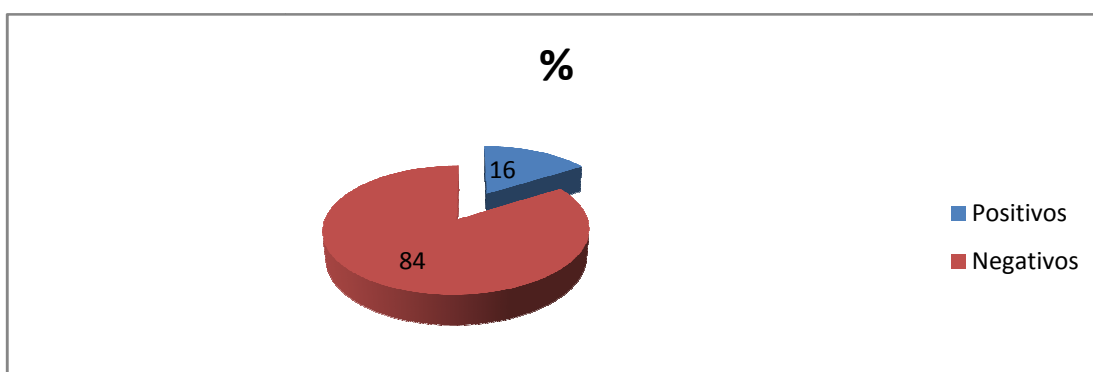


Figura 13: Percentagem de rastreios positivos e negativos, realizados no Laboratório de Patologia Clínica Hilário de Lima, em Braga, de 1 de Julho de 2012 a 31 de Agosto de 2012.

11.2 Testes de Suscetibilidade a Antibióticos

Todos os 34 isolados mostraram suscetibilidade à penicilina, ampicilina, ampicilina/sulbactam e cefuroxima. Quanto à clindamicina e eritromicina, 6 estripes das 34 isoladas revelaram resistência a estes dois antibióticos, resultando uma percentagem de resistências a eritromicina e clindamicina de 17,6%.

Tabela 5: Perfis de suscetibilidade dos 34 isolados de *S. agalactiae* (antibióticos incluídos na carta AST 586 (referência 22 276 da bioMérieux®).

Antibióticos	Perfis de Suscetibilidade n=34		
	Sensível	Resistência Intermediária	Resistente
Benzilpenicilina	34 (100%)	0	0
Ampicilina	34 (100%)	0	0
Ampicilina/sulbactam	34 (100%)	0	0
Eritromicina	28(82.4%)	0	6 (17.6%)
Clindamicina	28 (82.4%)	0	6 (17.6%)

Das 39 amostras recebidas do Hospital de Santo António no Porto, todas revelaram sensibilidade à penicilina, 13 revelaram resistência à eritromicina (33.4%) e 10 revelaram resistência à clindamicina (15.4%).

Tabela 6: Perfis de suscetibilidade dos 39 isolados de *S. agalactiae* recebidos do Hospital de Santo António no Porto.

Antibióticos	Perfis de Suscetibilidade n=34		
	Sensível	Resistência Intermediária	Resistente
Benzilpenicilina	39 (100%)	0	0
Eritromicina	26(66.7%)	4 (10.3%)	9 (23.1%)
Clindamicina	29 (74.4%)	0	10 (15.4%)

11.3 Fenótipos de Resistência à Eritromicina

Das 34 amostras isoladas de gestantes que recorreram ao Laboratório de patologia clínica, apenas 6 apresentaram resistência à eritromicina. Sendo testadas para determinação do fenótipo de resistência à eritromicina pelo método do duplo disco. Assim sendo as seis amostras apresentaram resistência simultânea à eritromicina e à clindamicina, revelando o fenótipo cMLS_B.

Das 39 amostras provenientes do Hospital de Santo António, no Porto, apenas 13 apresentaram resistência à eritromicina, sendo estas 13 amostras testadas para a determinação do fenótipo de resistência pelo método do duplo disco. Assim, 9 das 13 amostras apresentaram resistência simultânea à eritromicina e à clindamicina, apresentando o fenótipo cMLS_B (69,2%). 4 das 13 amostras revelaram resistência apenas à eritromicina, apresentando o fenótipo M (resistência apenas a macrólidos) (30,8%).

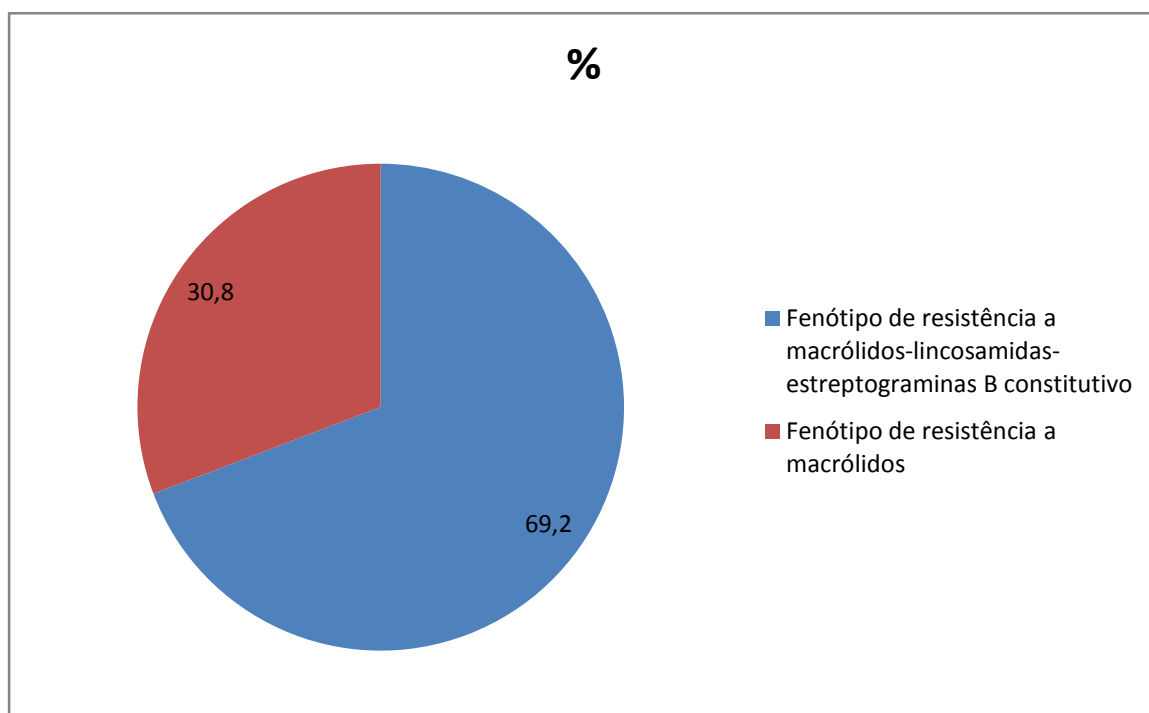


Figura 14: Distribuição fenotípica das estirpes resistentes à eritromicina, recebidas do hospital de Santo António, no Porto.

11. Discussão e Conclusão

Na década de setenta, emergiram os primeiros estudos sobre *Streptococcus agalactiae* que apontavam este microrganismo como uma importante causa de septicemia e meningite em recém-nascidos (Baker e Barret, 1973). Desde então, inúmeras pesquisas evidenciaram o estreptococo do grupo B como um dos agentes causadores de septicemia em recém-nascidos e defendem a prevenção da colonização neonatal como a principal forma de redução dessa grave infecção (Schuchat, 1998). A união de entidades como *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), *College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG) e *American Academy of Pediatrics* gerou um consenso de rastreio e profilaxia da infecção por *S. agalactiae* (Schuchat, 1998). Neste consenso, a necessidade de conhecer a prevalência da colonização de gestantes por esta bactéria é fundamental.

Devido à associação entre a presença de *Streptococcus agalactiae* na flora vaginal e retal da gestante e a possibilidade de colonização do recém-nascido, torna-se necessário, como primeiro passo para o estudo e compreensão do problema, determinar a percentagem de gestantes colonizadas por este microrganismo, conforme um dos objetivos deste estudo.

O grupo de estudo deste trabalho foi composto, de forma aleatória, por 212 gestantes, das quais 34 se mostraram colonizadas pelo estreptococo do grupo B de Lancefield. Estas parturientes estavam em idade gestacional acima da trigésima quinta semana, não apresentavam fatores de risco para a colonização por *S. agalactiae* e realizavam acompanhamento pré-natal sem apresentarem quaisquer patologias.

A frequência de colonização por *S. agalactiae* detetada neste estudo (16%) é superior à encontrada por autores nacionais (15,1% e 15%), respetivamente numa maternidade de Lisboa (Figueira-Coelho *et al.*, 2004) e do Porto (Chaves, B.A.2011.).

O resultado do perfil de suscetibilidade antimicrobiana mostrou que 100% dos isolados testados nesta pesquisa eram sensíveis à penicilina, ampicilina, ampicilina/sulbactam e cefuroxima, sendo semelhante ao relatado por outros autores (De Mouy *et al.*, 2001; Figueira-Coelho *et al.*, 2004;

Schoening *et al.*, 2005).

O antibiótico de escolha para o tratamento de infecções por *S. agalactiae* é a penicilina. Os isolados de *S. agalactiae* permanecem quase universalmente suscetíveis à penicilina, apesar de há mais de 60 anos se usar este antibiótico, ao contrário de outros organismos patogênicos que rapidamente desenvolveram resistência ao antibiótico. Deste modo, a penicilina continua a ser um fármaco bastante barato e eficaz para o tratamento de doenças graves por estreptococos do grupo B sendo que a maior desvantagem é cerca de 10 % da população ser alérgica a este antimicrobiano (Schrag *et al.*, 2002). No entanto, apesar da resistência a β -lactâmicos em *S. agalactiae* raramente ter sido relatada (Betriu *et al.*, 1994), um estudo descrito entre os isolados de *S. agalactiae*, mostra uma estirpe resistente à oxacilina associada ao cloranfenicol e com suscetibilidade intermediária à penicilina G, cefoxitina e ofloxacina (Traub *et al.*, 1997). Por outro lado, um recente inquérito descreveu algumas estirpes recuperadas de pús de pacientes idosos resistentes à ampicilina, cefazolina, cefepima e cefotaxima (Kimura *et al.*, 2008).

A resistência à eritromicina e à clindamicina emergiu durante a última década em muitos países (Schoening *et al.*, 2005). Os macrólidos são os agentes de segunda opção recomendados para a profilaxia de infecções por *S. agalactiae* em mulheres alérgicas a β -lactâmicos. Neste estudo, das 34 estirpes isoladas no Laboratório Hilário de Lima, 17.6% dos isolados apresentaram resistência à eritromicina e à clindamicina, sendo que todos os isolados resistentes apresentavam o fenótipo MLS_B constitutivo. Dos 39 isolados recebidos do Centro Hospitalar do Porto – Hospital de Santo António, 33.4% dos isolados apresentaram resistência a eritromicina, sendo que 23.1% apresentava resistência e 10.3% apresentava resistência intermédia, e 15.4% dos isolados apresentaram resistência à clindamicina. O fenótipo predominante nas estirpes resistentes foi o fenótipo MLS_B constitutivo (69.2%).

Esta predominância levanta questões preocupantes, já que a clindamicina, os macrólidos e as estreptograminas B também não podem ser utilizados como agentes terapêuticos e profiláticos nestes casos.

Relatórios anteriores de outros países mostram taxas de resistência da eritromicina e da clindamicina até 36% e 18%, respectivamente (Betriu *et al.*, 1994; De Mouy *et al.*, 2001). No entanto, as percentagens de resistência determinadas neste estudo são similares às relatadas também no nosso país para isolados obtidos num hospital de Lisboa (Figueira-Coelho *et al.*, 2004) e também às relatadas em isolados estudados em dois hospitais em Ottawa de 2002 a 2003 (Desjardins *et al.*, 2004). Na Bélgica, 16,7% e 11% das estirpes de *S. agalactiae* isoladas de gestantes apresentaram-se resistentes à eritromicina e clindamicina, respectivamente, sendo encontrado o fenótipo MLSB constitutivo na maioria delas (63,6%) (Decoster *et al.*, 2005). Já noutro estudo realizado em Itália foi observado que 19,2% das estirpes de *Streptococcus agalactiae* isoladas de parturientes se apresentaram resistentes à eritromicina e clindamicina, simultaneamente (Mosca *et al.*, 2006). Nos Estados Unidos verificaram-se recentemente índices de resistência à eritromicina e clindamicina de 54% e 33%, respetivamente, em isolados de gestantes, a partir da vagina e do reto (Dispersio e Dispersio, 2006), um valor de resistência muito superior ao encontrado na nossa pesquisa.

De acordo com nossos resultados, os antibióticos como a penicilina, ampicilina, ampicilina/sulbactam e cefuroxima mostram boa atividade *in vitro* frente a *S. agalactiae*, mas a sua utilização deve ser estritamente limitada aos casos com uma evidente falta de alternativas pois podem provocar reações anafiláticas severas ou a possível emergência de resistência antimicrobiana tanto em estirpes de *S. agalactiae* como noutros patógenos perinatais (Shet e Ferrieri, 2004).

Para um patógeno com as características de *Streptococcus agalactiae*, a estratégia de prevenção ideal seria a vacinação. Uma vacina segura, eficiente e de baixo custo seria mais simples de administrar, diminuiria os riscos associados ao uso extensivo de antibióticos, como a emergência de estirpes resistentes, e não influenciaria o processo do parto. O desenvolvimento desta vacina é atualmente uma das grandes prioridades da saúde pública (CDC.2010.). No entanto, enquanto ainda não é uma realidade, é necessário monitorizar frequentemente os índices de resistência aos antibióticos mais utilizados, como a penicilina, eritromicina e clindamicina. Além disso, o estudo dos mecanismos envolvidos na resistência à eritromicina e à clindamicina pode ajudar na

elucidação do surgimento e da transmissão desta resistência entre as estirpes de *S. agalactiae*, além de orientar os profissionais de saúde para a tomada de decisões corretas e eficientes quanto ao antibiótico a ser aplicado nos pacientes.

12. Referências Bibliográficas

- ☞ Abarzúa, F., Guzmán, A.M., Belmar, C., et al.(**2002**). Prevalencia de colonizacion por Streptococcus agalactiae (grupo B) en el tercer trimestre del embarazo. Evaluacion del cultivo selectivo. Experiencia en 2192 pacientes. Rev.Chil.Obstet.Ginecol. **67 (2)**:89-93.
- ☞ Almeida, A., Agro, J., Ferreira, L. Streptococcus β hemolítico do grupo B: Protocolo de rastreio e prevenção de doença perinatal.
- ☞ Baker, C.J. **1997**. Group B streptococcal infection. Clinics Perinatol. **24**: 59-70.
- ☞ Beardsall, K.(**2001**). Guidelines for Group B Streptococcus. Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed. **84**: 77-78.
- ☞ Benitz, W.E., Gould, J.B., & Druzin, M.L. **1999**. Risk factors for early-onset group B streptococcal sepsis: estimation of odds ratios by critical literature review. Pediatrics. **Vol 103, No 6**.
- ☞ Bou, G., Figueira, M., Canle, D., Cartelle, M., Eiros, J.M., & Villanueva, R. **2005**. Evaluation of group B streptococcus differential agar for detection and isolation of Streptococcus agalactiae. Clin. Microb. And Infection. **11, Nº.8**: 676 – 678.
- ☞ Bozdogan, B., Berrezouga, L., Kuo, M.S., Yurek, D.A., Farley, K.A., Stockman, B.J. & Leclecq, R. **1999**. A new resistance gene, linB, conferring resistance to lincosamides by nucleotidylation in Enterococcus faecium HM1025. Antimicrob. Agents Chemother. **43 (4)**: 925-929.
- ☞ CDC.**2010**. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. Novembre 19.
- ☞ Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (**1996**). Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease: A Public Health Perspective. MMWR. **45(RR-7)**: 1 – 24.
- ☞ Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (**2002**). Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. MMRW. **51 (RR11)**: 1 – 22.

- ☞ Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **(2005)**. Early-Onset and Late-Onset Neonatal Group B Streptococcal Disease---United States, 1996--2004. MMRW. **54 (47)**: 1205 – 1208.
- ☞ Cheng *et al.* **2002**. The group Streptococcal C5a peptidase is both specific protease and an invasive. Infect Immun, V.70, nº.5, May: 2408-2413.
- ☞ Chmouyguina *et al.* **1996**. Conservation of the C5a peptidase genes in group A and B Streptococci. Infect Immun, V.64, nº. 7 , Jul: 2387-2390.
- ☞ Chopra, I. & Roberts, M. **2001**. Tetracycline antibiotics: mode of action, application, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 232-260.
- ☞ Costa, N.M. **(2000)**. Streptococcus e Outros Cocos Gram Positivos Associados. In Ferreira, W.F.C., Sousa, J.C.F. (Eds), Microbiologia (Vol.2, pp. 52 – 57). Lisboa: Lidel.
- ☞ Croak, A., Abate, G., Goodrum, K. & Modrzakowski, M. **2003**. Predominance of serotype V and frequency of erythromycin resistance in Streptococcus agalactiae in Ohio. Am. J. Obstet. Gynecol. **188 (5)**: 1148-1150.
- ☞ De Azavedo, J.C.S, McGavin, M., Duncon, C., Low, D.E. & Megeer, A. **2001**. Prevalence and mechanisms of macrolide resistance in invasive and non invasive group B streptococcus isolates from Ontario, Canada. Antimicrob. Agents Chemother. **45**: 3504 – 3508.
- ☞ Domingo, P., Barquet, N., Alvarez, M., Cool, P. et al. **1997**. Group B Streptococcal meningitis in adults: report of twelve cases and review. Clin. Infect. Dis. **25 (5)**: 1180 – 1187.
- ☞ Farley, M.M. **2001**. Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. Clin. Infect. Dis. **33 (4)**: 556 – 561.
- ☞ Fernandez, M., Hickman, M. E. & Baker, C.J. **1998**. Antimicrobial susceptibilities of group B streptococci isolated between 1992 and 1996 from patients with bacteriemia or meningitis. Antimicrob. Agents Chemother. **42**: 1517 – 1519.
- ☞ Figueira-Coelho J, Ramirez M, Salgado MJ, Melo-Cristino J. **2004**. *Streptococcus agalactiae* in a Large Portuguese Teaching Hospital:

- ☞ Antimicrobial Susceptibility, Serotype Distribution, and Clonal Analysis of Macrolide-Resistant Isolates. *Microb Drug Resist.* 10:31-36.
- ☞ Fitoussi, F., Loukil, C., Gros, I., Clermont, O., Mariani, P., Bonacrosi, S., Thomas, I., Deforche, D. & Bingen, E.E. **2001**. Mechanisms of macrolide resistance.
- ☞ Forte, M. Infecçologia na gravidez. In Graça, L.M et al. (Eds), *Medicina Materno Fetal 2* (2ªed., pp. 550). Lisboa: Lidel.
- ☞ Gibson, R.L.; Nizet, V.; Rubens, C.E.**1999**. Group B streptococcal beta hemolysin promotes injury of lung microvascular endothelial cells. *Pediatr Res.* V.45. nº.5, PT1, May:626-634.
- ☞ Gosling, I.A., Stone, P.R. & Grimwood, K. **2002**. Early- onset group B streptococcus prevention protocols in New Zeland public hospitals. *Aust. N. Z. J. Obst. Gynecol.* **42 (4)**: 362-364.
- ☞ Grimwood, K., Stone, P.R., Gosling, I.A., Grenn, R., Darlow, B.A., Lennon, D.R & Martin, D.R. **2002**. Late antenatal carriage of group B streptococcus by New Zealand women. *Aust. N. Z. Obstet. Gynaecol.* **42 (2)**: 182- 186.
- ☞ Heath, H.(**2004**). GBS & Pregnancy: Group B Strep suport-preventing GBS infection in babies. In London.
- ☞ Hynes, W.L.; Walton, S.L. **2000**. Hyaluronidases of Gram positive bacteria. *Fems Microbiol Let.* V.183. n º.2. Feb 15: 201-207.
- ☞ Jolivet, R.R.Centers for Disease Control and Prevention (CDC).(2002). Early-Onset neonatal Group B Streptococcal infection: 2002 guidelines for prevention. *J.Midwifery Womens Health.* **47(6)**: 435- 446.
- ☞ Kieran, E., Matheson, M., Mann, A.G., et al. (**1998**). Group B Streptococcus (GBS) colonization among expectant Irish Mothers. *Ir. Med. J.* **91**: 21-22.
- ☞ Lança, S., Serrano, P., Barata, J. **2006**. Streptococcus agalactiae infection with multiple site involvement – a clinical case with a favourable outcome. *Medicina Interna.* **13**: 179 – 183.

- ☞ Lee, S.Y., Chee, S.P. **2002**. Group B Streptococcal endogenous endophthalmitis: case reports and review of the literature. *Ophtalmology*. **109 (10)**: 1879 – 1886.
- ☞ Lindahl, G., Carlemalm, M.S., & Areschoug, T. **(2005)**. Surface Proteins of *Streptococcus agalactiae* and Related Proteins in Other Bacterial Pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**: 102 – 127.
- ☞ López, J.G.S., & Teres, F.O. **2004**. Vacuna contra el estreptococo del grupo B (*Streptococcus agalactiae*). *Asociación Española de Vacunología*. Tema del Mês: Julio.
- ☞ Marques, M.B *et al.* **1992**. Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B Streptococci. *Infect Immun*. V.60. nº.10. Oct: 3986-3993.
- ☞ Matthies, C. *et al.* **2004**. *Lactovum miscens* gen. nov., an aerotolerant, psychrotolerant, mixed. Fermentative anaerobe from acid forest soil. *Res Microbiol*, V.155, n.10, V.82: 847-854.
- ☞ McKenna, D.S., Matson, S., Northern, I. **2003**. Maternal group B streptococcal genital tract colonization at term in women have asymptomatic GBS bacteriuria. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* **11**: 203 – 207.
- ☞ Munoz, P., Llancaqueo, A., Rodriguez, M.C. *et al.* **1997**. Group B streptococcal bacteraemia in nonpregnant adults. *Arch. Int. Med.* **157 (2)**: 213 – 216.
- ☞ Nizet, V., & Rubens, C. **2001**. Pathogenic Mechanisms and virulence factors for group B streptococci. *Asociación Argentina de Microbiología*. **Boletín Nº. 14**.
- ☞ Ortiz, M.P.C. & Vélez, J.D.L. **1996**. Importância clínica del streptococcus agalactiae como causante de infección. *Colombia Médica*. **27**: 53 – 58.
- ☞ Panupong, L., Chatrchai, W. **2001**. Group B Streptococcal bacteriemia in nonpregnant adults at a community teaching hospital. *Southern Medical Journal*. **94 (12)**: 1206 – 1211.

- ☞ Pereira, P.P., Lautenschlager, M.A.C., Maganha, C.A., Armelin, A.R. & Zugaib, M. **2002**. Streptococcus agalactiae e gravidez: histórico, actualidades e prespectivas. Rev Ginec & Obst. **13 (3)**: 163 – 166.
- ☞ Regan, J.A., Klebanoff, M.A., Nugent, R.P. **1991**. The epidemiology of group B streptococcal colonization in pregnancy. Obstet. Gynecol. **77 (4)**: 604 – 610.
- ☞ Regan, L. **(2008)**. A sua gravidez semana a semana. Dorling Kindersley. Resistance in clinical group B streptococci isolated in France. Antimicro. Agents Chemother. **45**: 1889-1891.
- ☞ Roberts, M.C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L.B., Rood, J. & Seppala, H. **1999**. Nomenclatura for macrolide and macrolide-lincosamide- streptogramin B resistance determinants. Antimicrob. Agents Chemother. **43 (12)**: 2823 – 2830.
- ☞ Rosenstein, N., Schuchat, A., et al. **1997**. Opportunities for preventions of perinatal group B streptococcal disease: a multistate surveillance analysis. Obst Gynecol. **90**: 901-906.
- ☞ Schrag, S.J., Phil, D., Zell, E.R., Stat, M., Lynfield, R., Roome, A. et al. **2002**. A population-based comparison of strategies to prevent early-onset group B streptococcal disease in neonates. N. Engl. J. Med. **347 (4)**: 233-239.
- ☞ Schuchat, A. **1998**. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigmas. Clin. Microbiol. Rev. **11**: 497 – 513.
- ☞ Schuchat, A., Deaver, K.R., Plitaytis, B.D., Zangwill, K., Mohle, J.B., & Wemger, J.D. **1994**. Multistate case-control study of maternal risk factors for neonatal group B streptococcal disease. Pediatr. Infect. Dis. J. **13**: 623 – 629.
- ☞ Silva, L.J.; Richtmann, R. **2006**. Vaccines under development: group B streptococcus, herpes-zoster, HIV, malaria and dengue. Jornal Pediat. 0021-7557/06/82. Supl S115: 115-117.
- ☞ Simões, H.V., & Manso, S.C. Infecções neonatais. In Rezende, J. (Eds), Obstetrícia (9º ed., pp. 1400 – 1401). Guanabara Koogan.

- 📖 Spellerberg, B.; Brandt, C. **2007**. *Streptococcus*. Manual of Clinical Microbiology 9th Ed. Washington, DC. ASM Press: 412-429.

